

**Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie
Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Mittelmeier**

**Resorbierbare Bioimplantate zur Regeneration von
chondralen Defekten in einer tierexperimentellen Studie
am Schaf**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock - Anstalt öffentlichen Rechts**



vorgelegt von

**Philipp Bergschmidt aus Bernau
Rostock, 2007**

Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0058-5

Dekan: **Prof. Dr. med. habil. Emil C. Reisinger**
Medizinische Fakultät der Universität Rostock
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Ernst-Heydemann-Strasse 6
18057 Rostock

1. Gutachter: **Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson**
Orthopädische Klinik und Poliklinik
LMU München, Klinikum Großhadern
Marchioninistraße 15
81377 München

2. Gutachter: **Prof. Dr. Joachim Rychly**
Medizinische Fakultät der Universität Rostock
Arbeitsbereich Zellbiologie
Schillingallee 69
18057 Rostock

3. Gutachter: **Prof. Dr. med. habil. Wolfram Mittelmeier**
Medizinische Fakultät der Universität Rostock
Klinik und Poliklinik für Orthopädie
Doberaner Strasse 142
18057 Rostock

	Seite
1. Einleitung	5
1.1 Chondrale Defekte und ihre Bedeutung	5
1.2 Morphologie und Regenerationsvermögen des hyalinen Gelenkknorpels	6
1.3 Klinische Therapiemöglichkeiten	11
1.3.1 Symptomatische Behandlungsprinzipien	11
1.3.2 Lavage und Debridement	11
1.3.3 Knochenmark-Stimulation-Techniken	11
1.3.4 Periostlappenplastik	12
1.3.5 OATS	12
1.3.6 Allogene osteochondrale Transplantation	13
1.3.7 Autologe Chondrozytentransplantation	14
1.3.8 Endoprothetik	15
1.4 Experimentelle Therapieansätze	16
1.4.1 Chondrogenese in vitro und in vivo (Ausgangszelle, Differenzierung, Kulturformen)	16
1.4.2 Trägermaterialien	18
1.4.3 Mechanische Induktion	19
1.5 Problemstellung	22

	Seite
2. Material und Methodik	24
2.1 Das Bioimplantat	24
2.1.1 Herstellung und Konstruktion des Bioimplantates	24
2.1.2 Schaffung der Knorpeldefekte und Verankerung der Bioimplantate	25
2.2 Experimentelles Design	27
2.2.1 Genehmigung des Tierversuchsvorhabens	27
2.2.2 Tiermodell	27
2.2.3 Narkoseverfahren	28
2.2.4 Operationstechnik	29
2.2.4.1 Gruppe 1: Leerloch	30
2.2.4.2 Gruppe 2: Bioimplantat	30
2.2.4.3 Gruppe 3: Bioimplantat plus Fibrin und Zellanreicherung	31
2.2.5 Postoperative Phase und Tierhaltung	32
2.3 Anfertigung der Histologien	33
2.3.1 Hämatoxylin-Eosin	33
2.3.2 Toloidin-Blau	34
2.3.3 Safranin-O	34
2.3.4 Kollagen I und Kollagen II	34
2.3.5 Aggrecan	35
2.4 Makroskopische- und mikroskopische Beurteilung	36
2.5 Statistische Auswertung	38

	Seite
3. Ergebnisse	39
3.1 Intra- und postoperativer Verlauf	39
3.2 Makroskopische Beurteilung	40
3.2.1 Gruppe 1: Leerloch	40
3.2.2 Gruppe 2: Bioimplantat	40
3.2.3 Gruppe 3: Bioimplantat plus Fibrin und Zellanreicherung	42
3.3 Mikroskopische Beurteilung	44
3.3.1 Gruppe 1: Leerloch	44
3.3.2 Gruppe 2: Bioimplantat	47
3.3.3 Gruppe 3: Bioimplantat plus Fibrin und Zellanreicherung	52
3.4 Ergebnisse und Auswertung mittels modifizierten O’Driscoll-Scores	57

	Seite
4. Diskussion	60
4.1 Bioimplantate	62
4.2 Chondrale Defekte im Schafsmodell	66
4.3 Beurteilungsschema der Ergebnisse	69
4.4 Ergebnisse	71
4.5 Ausblick	77
5. Zusammenfassung	79
6. Literaturverzeichnis	81
7. Anhang	91
Abkürzungsverzeichnis	91
Selbstständigkeitserklärung	92
Danksagung	93
Thesen	94

1. Einleitung

1.1 Chondrale Defekte und ihre Bedeutung

Die Tatsache, dass Läsionen im Gelenkknorpel sich von selbst nicht wieder regenerieren können, ist seit langem ein bekanntes Problem.^{51,57,80,99}

Somit müssen chondrale Defekte, die durch Trauma oder Chondromalazie entstanden sind, als irreversibel betrachtet werden. Mit dem Fortschritt der Operationstechniken und dem besseren Verständnis über die natürliche Langzeitentwicklung solcher Läsionen, die häufig in eine Arthrose mit einer zunehmenden Schmerzsymptomatik und Steifigkeit in den betroffenen Gelenken führt, erhöht sich auch das Interesse an operativen Behandlungsmöglichkeiten.^{82,117} Neben dem persönlichen Leid für jeden Menschen besitzt die zunehmende Arthrosehäufigkeit auch eine hohe sozialökonomische Bedeutung. Die Arthrose zeigte 1999 eine Prävalenz von 125 pro 1000 Amerikaner und ist damit Hauptgrund für krankheitsbedingte Arbeitsausfälle mit einem Gesamtkostenanteil von ca. 65 Billionen US-Dollar pro Jahr, wovon ca. 15 Billionen US-Dollar direkte medizinische Kosten sind.⁵⁶ Ähnlich gestaltet sich die Situation in Deutschland. Zwischen Oktober 1997 und März 1999 wurden in Deutschland mehr als 7000 Personen zwischen 18 und 79 Jahren befragt und untersucht. Davon konnten durch eine Erhebung des Robert Koch-Institutes in Berlin schließlich 6205 Datensätze ausgewertet werden. Demnach beträgt die Prävalenz der Arthrose in mindestens einer Gelenkregion insgesamt 28 Prozent. Von den unter 30-Jährigen ist dabei nur jeder zwanzigste an Arthrose erkrankt, bei den über 60-Jährigen jedoch jeder zweite.¹¹⁴

Bedingt durch dramatisch erhöhte Prävalenzraten im Alter und zunehmender Lebenserwartung wird die Zahl der betroffenen Personen weiter steigen.²² Somit wird die medizinische Behandlung der Arthrose zunehmend zu einem zentralen Problem in einer immer älter werdenden Generation.

1.2 Morphologie und Regenerationsvermögen des hyalinen Gelenkknorpels

Beim menschlichen Knorpelgewebe können 3 Formen unterschieden werden.⁴¹

- a) Elastischer Knorpel, welcher als makroskopisch gelblich wirkender Knorpel in den Cartilagine corniculatae und cuneiformes des Kehlkopfs, sowie in den Knorpeln des äußeren Ohrs und der Ohrtrumpete vorkommt.
- b) Faserknorpel, der physiologischer Weise als Übergangsform zwischen straffen Bindegewebe und hyalinen Knorpel in den Bandscheiben und Menisken zu finden ist.
- c) Hyaliner Knorpel, vorwiegend als Überzug knöcherner Strukturen in den Gelenken. **Dieser ist zentrales Objekt der Studie.**

Gelenkknorpel ist, wegen seiner Fähigkeit Stoßbelastungen und Oberflächenreibung im Gelenk zu reduzieren, essentiell für eine normale diarthrodiale Funktion. Für diese mechanoprotektiven Eigenschaften ist im Wesentlichen seine solid-flüssige Natur verantwortlich. Stoß- und Druckbelastungen werden durch Deformierung, die in einer Vergrößerung der Kontaktfläche resultieren, und durch eine Erhöhung des hydrostatischen Druckes in der interstitiellen Flüssigkeit, abgefangen. Auf diese Weise kann Gelenkknorpel Druck, aber auch Zug und Scherkräfte, bis zum 6-8 fachen des Körpergewichtes, ohne Schädigung der Zellen und der extrazellulären Matrix dauerhaft überstehen.⁵

Knorpel ist ein verhältnismäßig azelluläres Gewebe, mit einem Zellvolumen von durchschnittlich 2-10% des gesamten Knorpelvolumens.¹²⁶ Die übrigen Anteile des Gewebes bestehen zu 75-80% aus Wasser und einer dichten extrazellulären Matrix, die sich zu 50-70% aus kollagenen Fasern, 15-30% aus makromolekularen Proteoglykanen und 10-20% aus Glykoproteinen zusammensetzt.⁵

Chondrozyten sind für die Synthese der extrazellulären Matrix verantwortlich. Im unreifen Knorpel und während des Wachstums sind dementsprechend die Zelldichte und auch der Gehalt an extrazellulärer Matrix höher und nehmen mit zunehmenden Alter ab.^{85,126} Jeder Chondrozyt wird von einer schmalen ca. 2µm

breiten perizellulären Region umgeben, wobei mehrere Chondrozyten wiederum in kleinen Gruppen zusammenliegen und von einer weiteren Region, der Territorial Region, mit hohem Gehalt des Proteoglykans Aggrecan eingeschlossen werden.¹⁰⁵ Beim hyalinen Knorpel liegt zu 90% Kollagen-II vor und wird durch Kollagen-V, -VI, -IX und -XI ergänzt.¹⁰⁴ Der Faser-Knorpel weist hingegen Kollagen-I auf, welches im hyalinen Knorpel nicht vorkommt. Kollagenfibrillen können, wie Fasern eines Seiles, Zugkräften, aber nicht Druckkräften widerstehen. Die Festigkeit gegenüber Kompression wird entscheidend durch den Gehalt an makromolekulären Proteoglykanen bestimmt. Durch ihren hydrophilen Charakter binden Proteoglykane große Mengen Wasser und Elektrolyte im intra- und extramolekularen Raum, welches unter Druckbelastung durch die nur gering permeable extrazelluläre Matrix gepresst wird. Auf diese Weise geht ein entscheidender Teil der Druckenergie durch Reibung zwischen flüssiger und solider Phase verloren.⁷⁶ Hauptproteoglykan ist das Aggrecan. Das Grundgerüst setzt sich aus Hyaluronsäuremolekülen zusammen, welches eine enge Assoziation zum komplexen Kollagenfibrillennetzwerk besitzt.⁶⁴ Multiple Glykosaminoglykanketten (Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatan-sulfat, Keratan-sulfat) werden durch Link-Proteine in ihrer Bindung an die Hyaluronsäuremoleküle stabilisiert (Abb. 1). Die negativen Ladungen der Glykosaminoglykanketten sind letztendlich für den Quellungsdruck verantwortlich. Lediglich das dreidimensionale Kollagenfibrillennetzwerk selbst wirkt dem Quellungsdruck entgegen und setzt das Gewebe unter Spannung, was zu seiner Verformungsfestigkeit führt und Grundlage für eine normale Gelenkfunktion ist.¹⁰⁴

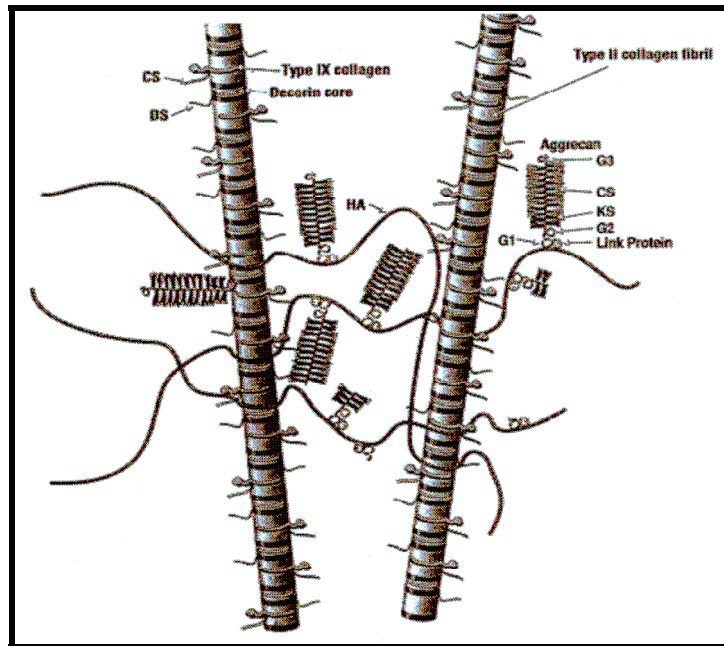


Abb.1: Graphische Darstellung eines Kollagenfibrillennetzwerkes in Assoziation mit Proteoglykan-Aggregaten (aus Ref.¹⁰⁴)

Hyaliner Knorpel zeigt in seiner Architektur 4 Zonen: (Abb.2)

Die superfiziale Zone macht ca.10% des Knorpels aus, bestimmt dessen lasttragende Eigenschaften und liefert die Gleitflächen für die Artikulation. Gelenkseitig findet sich eine zellfreie Schicht aus kleinen Fibrillen und wenig Polysacchariden, die Lamina Splendens.²⁰ Die darunter liegenden Chondrozyten und Kollagenfibrillen sind parallel zur Gelenkoberfläche ausgerichtet. Nur die spindelförmigen Chondrozyten dieser Zone und Synovialzellen sezernieren das Superfizialzonen-Protein, welches eine fast reibungslose Artikulation ermöglicht.¹¹⁵

In der Transitionalzone liegen sphärische Chondrozyten in einem ungeordneten Netzwerk aus Kollagenfibrillen. Die Konzentration an Proteoglykanen ist höher, der Wasser- und Kollagengehalt ist im Vergleich zur superfizialen Zone niedriger.²⁰

Die tiefe Zone zeigt klusterartig liegende Chondrozyten mit einer perpendikulären Ausrichtung zur subchondralen Platte. Der Proteoglykangehalt und Kollagenfibrillendurchmesser ist in dieser Zone am größten, obwohl der Kollagengehalt sein Minimum erreicht.

Als Verbindung zwischen Knorpel und subchondralen Knochen dient die Kalzifizierungszone mit hypertrophen Chondrozyten und teilweise kalzifizierter

Matrix. Die mechanischen Eigenschaften dieser Zone stellen ein Intermedium zwischen Knorpel und Knochen dar.¹⁰⁴

Ausdifferenzierter Gelenkknorpel weist keine Blutgefäße auf. Im Unterschied zu vaskularisiertem Gewebe erfolgt der Austausch von Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukten durch reine Diffusion. Die biomechanischen Interaktionen unter Belastung führen zu Druckunterschieden im Gewebe, was für eine optimale Diffusion entscheidend ist.²⁰

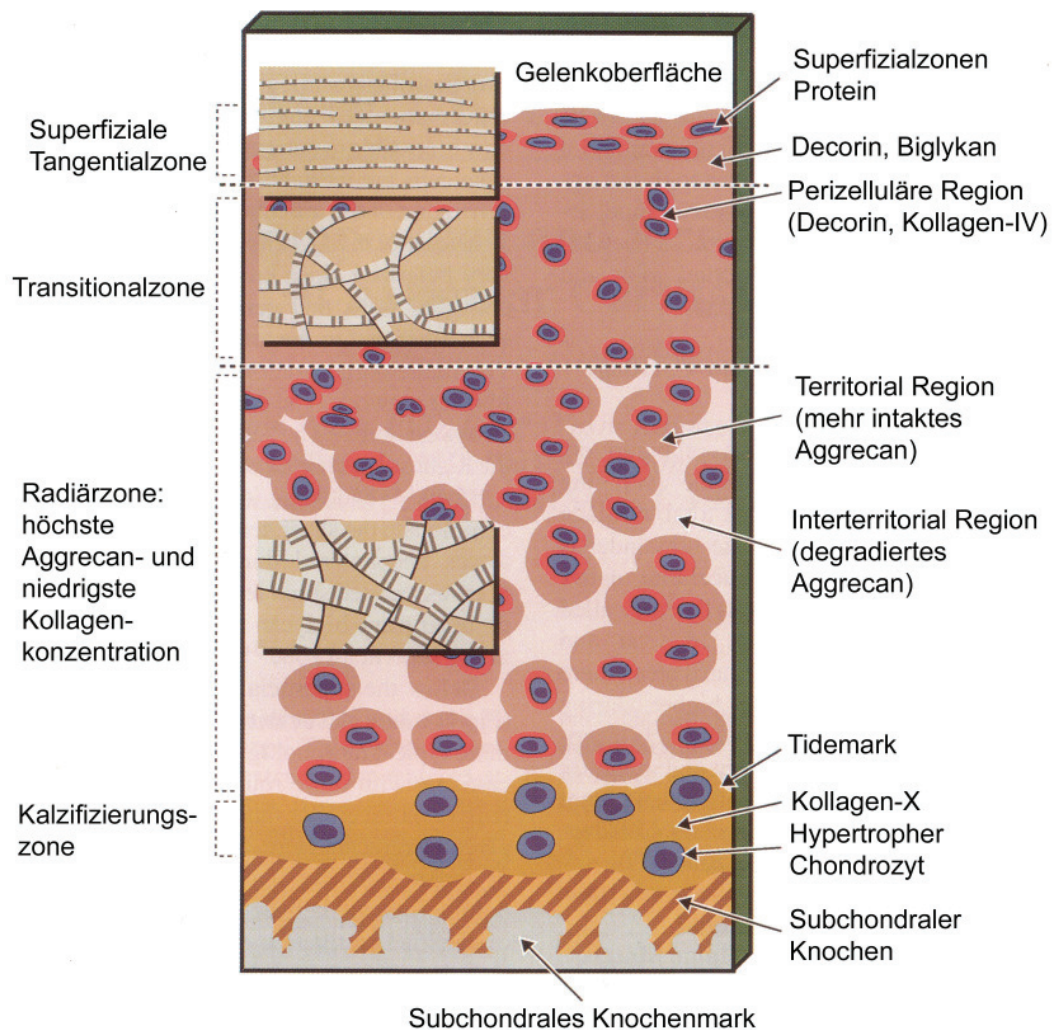


Abb.2: Schematische Darstellung der Zoneneinteilung von hyalinem Knorpel (Ref.¹⁰⁴)

Oberflächliche Knorpeldefekte, die nicht den subchondralen Knochen durchbrechen heilen nicht und schreiten in eine Degeneration der Gelenkfläche fort. Verletzungen rufen zwar eine kurzzeitige Gewebeantwort in Form von gesteigerter Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese hervor, jedoch können

durch die fehlende Vaskularisierung nicht genügend suffiziente Zellen für eine Regeneration bereitgestellt werden.^{39,42,74} Osteochondrale Defekte, d.h. Defekte die den subchondralen Raum eröffnen, finden Anschluß an das Knochenmark mit der Folge des Einblutens in den Defekt. Die reparative Antwort wird eingeleitet, welche die Bildung eines Fibringerinnsels, Zellmigration aus dem Knochenmark und die damit assoziierte Vaskularisierung beinhaltet.⁵⁵ Zusätzlich werden große Mengen an Wachstumsfaktoren freigesetzt.¹⁰⁹ Aus dem Knochenmark wandern unter anderem auch mesenchymale Stammzellen ein. Diese besitzen die Fähigkeit sich in unterschiedliche Zelllinien zu differenzieren, abhängig von lokalen Einflüssen.^{13,55,57} Das entstehende Regenerationsgewebe ist ein Mix aus fibrösen, fibrocartilaginären und hyalinartigen Anteilen und weist nicht die mechanische Stabilität des hyalinen Knorpels auf. Es degeneriert innerhalb kürzester Zeit bis zur Arthrose.^{28,40,55,117}

1.3 Klinische Therapiemöglichkeiten

1.3.1 Symptomatische Behandlungsprinzipien

Das Hauptziel der symptomatischen Behandlung ist die Besserung von sekundären Symptomen wie Schmerz und Funktionseinschränkung. Neben der Aufklärung des Patienten über den Krankheitsprozess stehen Modifikationen der Lebensweise, Gewichtsreduktion und physiotherapeutische Maßnahmen im Vordergrund. Unterstützend werden pharmakologische Therapien mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), selektiven COX-2 Inhibitoren, lokalen Corticosteroiden, Hyaluronsäure Injektionen und chondroprotektiven Agenzien, wie orale Glucosamine und Chondroitinsulfate, angewendet. Mit diesen Methoden können Symptome kurzzeitig gebessert werden. Jedoch ist eine eindeutige Wirksamkeit in der Behandlung der Läsion bisher noch nicht erwiesen.⁵⁵

1.3.2 Lavage und Debridement

Lavage und arthroskopisches Debridement sind Techniken, die auf eine temporäre Besserung der mit der Knorpelläsion assoziierten Symptome ausgerichtet sind und keine Reparatur der Läsion induzieren. Der Nutzen einer Lavage liegt in der Entfernung von degenerativen Knorpelteilchen, proteolytischen Enzymen und inflammatorischen Mediatoren. Debridement zeigt einen Vorteil in der Entfernung von partiell abgelöstem Knorpel und in der Glättung der Gelenkfläche. Es wird von guten Ergebnissen bei 50-70% der Patienten berichtet. Da bei beiden Techniken der subchondrale Raum nicht eröffnet wird, kommt es nicht zur Migration und Proliferation von Zellen aus dem Knochenmark, was ein limitiertes oder fehlendes Reparaturspotential zur Folge hat.^{7,48,123}

1.3.3 Knochenmark-Stimulations-Techniken

1959 beschrieb Pridie, dass die Perforation der subchondralen Knochenplatte eine „vaskuläre Heilungsantwort“ herbeiführt.¹⁰⁶ Arthroskopische Bohrtechniken, wie die Pridie-Bohrung, zeigen teilweise befriedigende Ergebnisse.⁵⁸ Durch die

Eröffnung des subchondralen Raums kommt es zum Einbluten in den Defekt mit der Ausbildung eines Fibringerinnsels und nachfolgender Migration von mesenchymalen Stammzellen, die sich unter den lokalen Gegebenheiten differenzieren. Das dabei entstehende Regenerationsgewebe beinhaltet überwiegend Kollagen-I, wie man es im Faserknorpel findet und besitzt nicht die biomechanischen Charakteristiken des hyalinen Knorpels.⁵⁵

Eine neuere Technik ist die Mikrofrakturierung, bei der durch punktförmiges Aufbrechen der subchondralen Knochenplatte mit speziellen Instrumenten thermische Schäden des Gewebes vermindert werden. Die histologischen und klinischen Ergebnisse liefern jedoch kaum eine Verbesserung gegenüber den anderen Knochenmark-Stimulations-Techniken.^{43,124}

1.3.4 Periostlappentechnik

Verschiedene Studien an Kaninchen, Pferden und Menschen konnten zeigen, dass Zellen der inneren Schicht („Cambium Layer“) von Periostlappen ein chondrogenes Potential besitzen.^{92,93,131} Bei diesen Verfahren wird das autologe Transplantat über dem Defekt fixiert, wobei die klinischen Ergebnisse durch viele Faktoren beeinflusst werden. Sowohl Größe und Lokalisation des Defektes, als auch die Fähigkeiten des Operators, insbesondere bei der technisch schwierigen Gewinnung des Transplantates, führen nur zu befriedigenden Ergebnissen bei ca.60% der Patienten.⁹⁴

1.3.5 OATS

Das „osteocondrale autograft Transplantations-System“ (OATS) oder auch Mosaikplastik bedient sich osteochondraler Zylinder, die an einer weniger lasttragenden Stelle im selben Gelenk oder einem anderen Gelenk entnommen und in eine osteochondrale Läsion transplantiert werden (z.B. Entnahme am lateralen ventralen Femurkondylus und Transplantation in die Talusgelenkfläche). Mit dem Ziel eine 60-80% Deckung des Defektes zu erreichen, wird dieses Verfahren durch den Mangel an geeigneten Entnahmestellen limitiert. Zudem gibt es Hinweise, dass eine unvollständige Heilung mit Faserknorpel an der Entnahmestelle zu arthrotischen Veränderungen im Gelenk führt und somit das

Problem nur von einer lasttragenden auf eine weniger lasttragende Stelle verschoben wird.⁵³ Eine schlechte Fixierung der Zylinder kann Mikrobewegungen in ihnen hervorrufen, die zu Inkongruenzen in der Gelenkfläche mit nachfolgender Degeneration des hyalinen Knorpels führen. Zusätzlich wurde die Entstehung von subchondralen Zysten beobachtet.⁹⁸

Dennoch konnte Hangody et al in einer Studie an 227 Patienten bei 86-90% eine Verbesserung der klinischen Symptomatik feststellen.⁴⁷

1.3.6 Allogene osteochondrale Transplantation

Dieses Verfahren besitzt die größte Bedeutung für die Behandlung von größeren Läsionen ($>2,5 \text{ cm}^2$), insbesondere im Rahmen der Tumorchirurgie, aber auch bei traumatischen- und Osteochondrosis dissecans Läsionen.²⁷ Der Vorteil liegt in der Bereitstellung von osteochondralen Transplantaten mit voll ausgeformtem hyalinem Knorpel ohne spezifische Limitation im Hinblick auf die Größe des Defektes. Wesentlicher Faktor für gute Ergebnisse stellt die Zellvitalität des Transplantates dar. Es sollte angestrebt werden, das Transplantat innerhalb von 24 Stunden nach dem Tod des Spenders zu transplantieren, obwohl neuere Studien zeigen konnten, dass eine Lagerung bei 4°C nach 4 Wochen zu keinen signifikanten Veränderungen in der Zellmorphologie und in den biomechanischen Eigenschaften geführt hatten.³ Methoden wie frisches Einfrieren und Gefriertrocknen haben im Vergleich zu frischen Transplantaten schlechtere Ergebnisse.^{3,75} Ein großer Nachteil dieses Verfahrens besteht in zellulären und humoralen Abwehrreaktionen, die durch gründliches Spülen des Transplantates und Abgleichen der MHC-Antigene von Spender und Empfänger reduziert werden können. Die klinische Bedeutung dieser Abwehrreaktionen wird jedoch kontrovers diskutiert, so dass eine Immunsuppression bisher nicht zum Goldstandard gehört.^{37,110,125} Hingegen gilt das Risiko von Krankheitsübertragungen, insbesondere von HIV und Hepatitis, als gesichert. Trotz der erheblichen Nachteile erreicht die allogene osteochondrale Transplantation gute bis sehr gute Ergebnisse bei 70-80% der Patienten nach 10 Jahren.²⁷

1.3.7 Autologe Chondrozytentransplantation

Das Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) eignet sich für die Therapie von symptomatischen Läsionen $>4\text{cm}^2$. Brittberg et al stellten 1994 erstmalig diese Methode vor.¹⁶ Während einer ersten arthroskopischen Begutachtung der Knorpelläsion, werden Chondrozyten biopsiert und in einer Zellkultur amplifiziert. In einer zweiten operativen Sitzung erfolgt die Präparation und wasserdichte Abdeckung des Defektes mit einem Periostlappen, Nahtmaterial und Fibrinkleber mit nachfolgender Injektion der amplifizierten Chondrozyten.^{16,84} Inzwischen sind diverse Modifikationen der Transplantationstechnik Gegenstand der Forschung. Nachdem erkannt wurde, dass eine dreidimensionale Zellanordnung in einer Matrix für die phänotypische Stabilität der transplantierten Chondrozyten von großer Bedeutung ist, werden zunehmend Matrixsubstanzen wie z.B. Agarosegel, Alginat, Fibrin oder auch Polymere als Trägersubstanzen erprobt.^{14,100} Desweiteren kommen resorbierbare beidseits mit Zellen beladenen Membranen (Kollagenvliese beladen mit einem Zellgelgemisch) als sog. Sandwich-Technik zum Einsatz.¹⁸ Bandinstabilitäten, Gelenkfehlstellungen, Meniskusschäden und tiefe osteochondrale Defekte sind Kontraindikationen für dieses Verfahren.⁸⁷ Zudem stellt die ACT hohe Anforderungen an die Patientencompliance. Die Patienten müssen sich zweimal einer Op-Prozedur unterziehen und postoperativ für 4-6 Wochen auf eine strenge Teilbelastung achten. Nachteilig müssen auch die hohen Kosten dieser Technik, sowie die Entstehung eines Entnahmedefektes, auch wenn dieser im nichtlasttragenden Bereich mit 2mm relativ klein ist, berücksichtigt werden.

Peterson et al¹⁰¹ evaluierte die klinischen, arthroskopischen und histologischen Ergebnisse der ACT an 101 Patienten. Histologisch ließ sich in 70% der Fälle ein hyalinartiger Knorpel nachweisen, die übrigen 30% stellten sich als eine Kombination aus Bindegewebe, hyalinartigen Anteilen und Faserknorpel dar. Steifigkeitsmessungen korrelierten mit den histologischen Ergebnissen und zeigten in den hyalinartigen Proben eine ähnliche Steifigkeit wie bei gesundem hyalinem Gelenkknorpel. Klinisch kam es in 80-90% der Fälle zu einer symptomatischen Besserung bis hin zur Beschwerdefreiheit. Knutsen et al⁶⁵ hingegen konnte in einem klinischen Vergleich ein Jahr postoperativ zwischen der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) und der Mikrofrakturierung an 80

Patienten sowohl klinisch als auch histologisch keinen Unterschied in beiden Therapiegruppen finden. Das Regenerat stellte sich in beiden Gruppen histologisch inhomogen von bindegewebiger Narbe bis hin zu faserknorpelähnlichen und hyalinartigen Strukturen dar. Es gibt jedoch Hinweise auf eine frühere Degeneration des Regenerates nach Mikrofrakturierung und damit der vorzeitigen Entstehung einer Arthrose.^{40,55,117}

1.3.8 Endoprothetik

Trotz der Vielzahl der Möglichkeiten zur gelenkerhaltenen Therapie stellt die Endoprothetik bei anhaltender Beschwerdesymptomatik oft den letzten Ausweg für viele Patienten dar. Derzeit werden in Deutschland ca. 50000 Knieendoprothesen pro Jahr mit steigender Tendenz implantiert.¹⁴¹ Die endoprothetische Versorgung ist insbesondere für jüngere aktive Patienten nicht Methode der Wahl, da aufgrund von Materialabnutzung, sowie aseptischer- und septischer Lockerung die durchschnittliche Lebenserwartung von Endoprothesen limitiert ist. Jeder Wechsel führt zu einer Reduktion des Knochenlagers, welches Voraussetzung für eine suffiziente Verankerung der Endoprothese ist. Hierdurch besteht nach mehrfachem Wechsel nur noch die Möglichkeit der Arthrodeese des Kniegelenkes, Sprunggelenkes oder einer Girdlestone Situation des Hüftgelenks mit massiver Einschränkung der Lebensqualität.

1.4 Experimentelle Therapieansätze

1.4.1 Chondrogenese in vitro und in vivo (Ausgangszelle, Differenzierung, Kulturformen)

Hyaline oder hyalinartige Knorpelanteile lassen sich bei allen derzeitigen operativen Therapiemöglichkeiten zwar nachweisen, dennoch ist keines der unter 1.3 genannten Verfahren in der Lage, ein dauerhaftes funktionelles Knorpelregenerat im Erwachsenen Organismus zu bilden. Das „Tissue engineering“ kombiniert Aspekte der Zellbiologie, Materialwissenschaften und der Chirurgie mit dem Ziel ein neues funktionell gleichwertiges Gewebe zu züchten.¹³⁷

Experimentelle Studien benutzen Chondrozyten^{46,54,100} oder periostale Zellen^{92,131} als Ausgangszellen. Beide Zelltypen haben den Nachteil der limitierten Verfügbarkeit, dessen Bedeutung unter der Tatsache, dass autologe Zellen bessere Ergebnisse liefern als allogene Zellen, noch zusätzlich wächst.³¹ Chondrozyten lassen sich in vitro nach Zellisolation expandieren. Als ausdifferenzierte Zellen sind im Idealfall die Ausgangs- und Endzellen identisch.⁶⁹ Dies erscheint problematisch, da Chondrozyten je nach Position im Gelenk und in der Knorpelschicht eine variable Differenzierung erfahren haben, ein unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Matrixproduktion zeigen und sich nicht an beliebigen Stellen als Transplantat verwenden lassen.⁶¹

Ein alternativer Ansatz besteht in der Nutzung von undifferenzierten Vorläuferzellen, die sich unter bestimmten Bedingungen in alle wesentlichen Zelltypen des Stützgewebes differenzieren können.^{11,24} Caplan definierte den Begriff „mesenchymale Stammzelle“ und zeigte, dass sich diese Zellen über Chondroprogenitorzellen, Chondroblasten bis hin zum entdifferenzierten hypertrophen Chondrozyten entwickeln können.^{19,23} Trotz verschiedenster Ansätze mesenchymale Stammzellen in vitro oder auch in vivo zu differenzieren, ist es bisher nicht gelungen, einen einheitlichen hyalinen Knorpel zu züchten.^{57,59,60,137,139}

Zahlreiche Kulturformen werden derzeit im Hinblick auf eine Optimierung der Kulturbedingungen erprobt. Das einfachste Modell ist die Monolayerkultur, in der

Chondrozyten nach Adhärenz in einer Flachbodenschale konfluieren und sich damit gut vermehren lassen. Mehrere Studien konnten jedoch zeigen, dass ausdifferenzierte Chondrozyten in solchen Kulturen ihre phänotypischen Eigenschaften, charakterisiert durch ihre runde Zellmorphologie sowie ihre Fähigkeit Kollagen-II und gewebespezifische Proteoglykane zu produzieren, verlieren.^{10,44,111,136} Die Gründe hierfür sind vielfältig. So beeinflussen Sauerstoffpartialdruck, pH-Wert, Kulturmedium, Temperatur, aber auch Zelldichte, Zell-Zell-Kontakte und räumliche Anordnung und der fehlende zyklische Druck, welcher aus der Gelenkbewegung resultiert, die Differenzierung von Chondrozyten.¹¹³ Mit dem Ziel die histochemischen, biochemischen und biomechanischen in vivo Konditionen auch ex vivo nachzustellen, haben sich dreidimensionale Konstrukte in Bioreaktoren durchgesetzt. Auf dreidimensionalen Trägerstoffen ausgesäte Zellen werden dabei in Wachstumskammern eingebracht, die das Nährstoffangebot, den Gasaustausch und den gleichmäßigen Kontakt von jeder Zelle zum Kulturmedium regulieren. Des Weiteren bieten Bioreaktoren die Möglichkeit durch Rotation oder intermittierenden hydrostatischen Drücken die Zellen mechanischen Stimuli auszusetzen, welche positive Effekte auf Matrixproduktion und Zellorganisation haben. Das so entstandene Gewebe bleibt dennoch faserarchitektonisch minderwertig.^{36,49}

Neuere Studien versuchen mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Proliferation, Differenzierung und Synthese von extrazellulärer Matrix positiv zu modulieren.^{33,86,143} IGF-I, IL-4 und Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie, die auch BMP-2 einschließt, zeigen einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation und Syntheseleistung von extrazellulären Matrixbestandteilen. PDGF hingegen vermindert das Gewebewachstum.¹² Problematisch erscheint jedoch die unterschiedliche Wirkung von Wachstumsfaktoren in vitro und in vivo. Durch ein IGF-I bindendes Protein, welches in entzündeten Gelenken vermehrt vorkommt, wird die Wirkung des IGF-I aufgehoben.³⁰ TGF- β hingegen fördert die Sensitivität von Chondrozyten in entzündeten Gelenken, hat jedoch wie auch BMP-2 als Nebeneffekt die Ausbildung von Chondrophyten, die im weiteren Verlauf zu Osteophyten kalzifizieren, zur Folge.^{132,133} Auf der Suche nach selektiv auf Chondrozyten wirkenden Wachstumsfaktoren wurden CDMPs identifiziert. Weitere Studien müssen jedoch erst die Effektivität dieser Faktoren

belegen.³² Aufgrund der komplexen Wirkungen unter biologisch nie einheitlichen Ausgangslagen im geschädigten Gelenk, bleibt dieses Gebiet weiterhin im Interesse der Forschung.

1.4.2 Trägermaterialien

Wie schon unter 1.4.1 erläutert, bieten dreidimensionale Konstrukte einige Vorteile im Rahmen des „Tissue engineerings“. Es liegen Hinweise vor, dass Kollagen-Gele als Trägermaterial die Chondrozytenproliferation fördern, aber auch zu einer Dedifferenzierung in Richtung des fibroiden Phänotyps führen.^{116,134} Dennoch konnten Wakitani et al die Bildung von hyalinähnlichen Knorpel durch allogene Chondrozyten in Kollagengelen nachweisen.¹³⁸ Derzeit wird gewöhnlich Kollagen-I als Träger verwendet. Eine Untersuchung von Nehrer et al zeigte jedoch Kollagen-II, als natürlicher Bestandteil des hyalinen Knorpels, als überlegen.⁹⁰ Native Hyaluronsäure, als wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix, besitzt einen positiven Effekt auf Zellproliferation und Synthese von Glykosaminoglykanen. Sie lässt sich aufgrund ihrer physiochemischen Struktur allerdings nicht zu einem dreidimensionalen Konstrukt formen.⁶³ Chemische Modifikation führt zur verbesserten strukturellen Integrität mit dem Nachteil einer schlechteren Biokompatibilität.⁶ Chitosan, das Co-Polymer von Glykosaminoglykan mit N-Acetylglukosamin weist eine gute Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit auf. Materialform und Porendurchmesser lassen sich leicht regulieren und es besitzt zudem das Potential, kleine vorher gebundene Peptide, wie z.B. Wachstumsfaktoren, freizusetzen.^{62,79} In vitro unterstützt es nachweislich die Expression von kartilaginären extrazellulären Matrixproteinen von humanen Chondrozyten, in vivo Studien stehen noch aus.¹²⁷ Eine ähnlich leichte Handhabung bietet Fibrin, da es sich in der löslichen Phase als Fibrin-Zell-Mix präzise in eine dreidimensionale Form bringen lässt. Aufgrund seiner atoxischen physiologischen Abbauprodukte erscheint es als Matrix hervorragend geeignet.¹³⁵ In Fibrin eingebettete Chondrozyten behalten in vitro ihre Zellmorphologie, proliferieren und bilden eine extrazelluläre Matrix. In vivo Studien erörterten jedoch die insuffiziente biomechanische Stabilität.^{50,135}

Alginat und Agarose Gele stabilisieren den chondrozytären Phänotyp, bzw. führen zu einer Reexpression nach Dedifferenzierung von Chondrozyten in einer Monolayerkultur.^{10,134} Durch das Auftreten von immunologischen Abwehrreaktionen und Riesenzellen in vivo, sowie die Hemmung von Eigenreparaturmechanismen, scheinen diese Materialien als Matrix ungeeignet zu sein.^{34,107}

Mit dem Ziel ein optimales Trägermaterial zu finden, kommen synthetische bioresorbierbare Polymere immer mehr in das Interesse der Forschung. Polyglykosid- und Polylactid-Polymere können durch strukturelle Modifikation relativ einfach zu geeigneten Vliesen oder Schäumen verarbeitet werden. Die derzeitigen Degradationscharakteristiken mit Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich durch die Abbauprodukte Milchsäure und Glykolsäure können in vivo eine Riesenzellreaktion auslösen.^{1,122} Des weiteren besitzen diese Materialien schlechte Eigenschaften bezüglich der Zelladhäsion.⁷⁷ Trotz dieser Nachteile werden Polymere aufgrund ihrer vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten in ihren mechanischen und biologischen Charakteristiken eine entscheidende Rolle in der Behandlung von Knorpeldefekten spielen.⁷¹

1.4.3 Mechanische Induktion

Seit über 150 Jahren ist bekannt, dass mechanische Stimuli einen Einfluss auf Differenzierung und Metabolismus von Zellen haben. Bereits 1827 beschrieb Andral die chondrogene Transformation mesenchymalen Gewebes am Beispiel der fibrokartilaginären Differenzierung der Aorta.⁴ In der ersten Demonstration der Beziehungen zwischen mechanischen Kräften und Knochenumbau zeigte Wolff 1869, wie sich Knochendichte und Spongiosaarchitektur abhängig von der Belastung verändern.¹⁴² Pauwels, aufbauend auf den Überlegungen von Roux¹¹² und Benninghoff⁸ Anfang des 20. Jahrhunderts, postulierte schließlich das Konzept der „Kausalen Histiogenese“. Er entwickelte generelle Konzepte, um die mechanischen Einflüsse auf die Gewebedifferenzierung zu erklären, indem er die wirkende Kraft auf ein Gewebe und die darauf folgenden Druck- und Zugbelastungen im Gewebe abschätzte. In seiner Schlussfolgerung nahm er an, dass Zellen zwischen einer Deformation ohne Druckanstieg sowie einem Druckanstieg ohne Deformation unterscheiden und darauf in unterschiedlicher

Weise reagieren (Abb.3).^{96,97} Kummer bestätigte die Theorie Pauwels mathematisch anhand der Knochendichteverteilung bei Belastung.⁶⁸

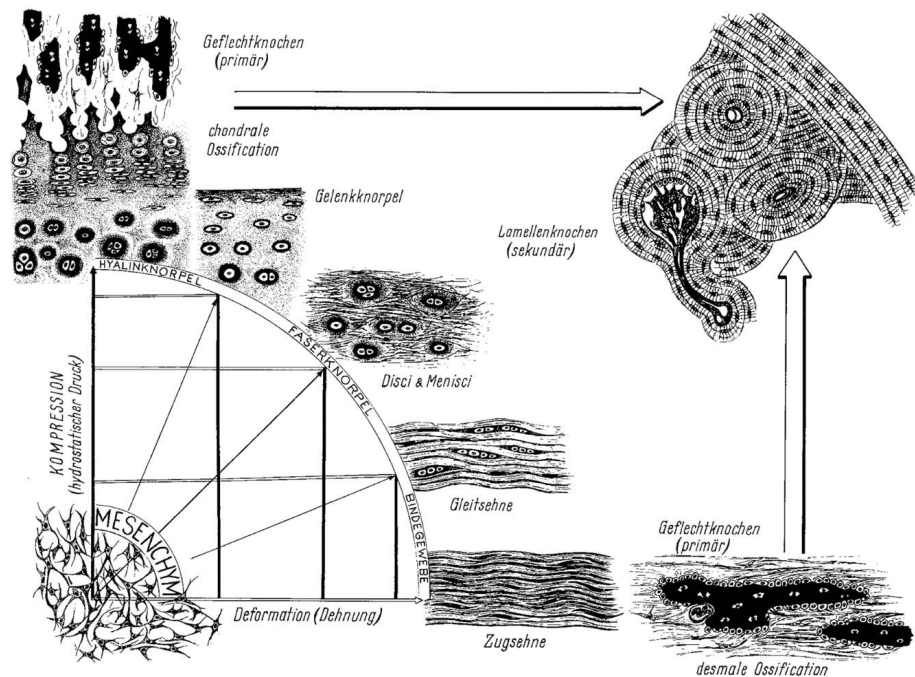


Abb.3: Schematische Darstellung der „Kausalen Histiogenese“ nach Pauwels (aus Ref.⁶⁸)

Verschiedene Arbeitsgruppen versuchen die Beobachtungen von Pauwels als Grundlage für die Reparatur von Knorpeldefekten zu nutzen. Carter et al konnte in Versuchen an Mäusen zeigen, dass intermittierende Scherkräfte den Prozess des Knorpelwachstums, der Reifung und anschließenden Ossifikation beschleunigen. Intermittierender hydrostatischer Druck bewirkt den Erhalt des Knorpels.²⁵ Tägil und Aspenberg implantierten Titankammern in Rattentibiae, die ihnen erlaubten zyklische Kompressionen mit definiertem Druck und Frequenz auf die darin einwandernden mesenchymalen Stammzellen auszuüben. Auch sie konnten die Induktion von Knorpel nachweisen.¹²⁸ Gomar-Sancho zeigte in einer Studie an Kaninchen die Bildung von lichtmikroskopisch hyalinartigen Knorpelanteilen in osteochondralen Defekten nach 4 Wochen, die allerdings nach 12 Wochen ulzerierten und eine Arthrose hinterließen. Mesenchymale Stammzellen und nicht Zellen der Synovia liegen seiner Meinung nach dem Regenerationsprozess zu Grunde.⁴⁵ Dieses konnte Jansson et al in einer

tierexperimentellen Untersuchung ebenfalls am Kaninchenmodel mit einem resorbierbarem Knochen-Knorpel-Ersatztransplantat bestätigen.⁵⁷

Neben der Bedeutung der Biomechanik für die Differenzierung, sollte die wichtige Rolle als Stimulus für die Synthese von extrazellulärer Matrix nicht vergessen werden. Mehrere Studien konnten dies sowohl in Zellkulturen aber auch in Knorpelimplantaten zeigen.^{49,70,95}

1.5 Problemstellung

Die geschilderten Daten aus der Literatur zeigen, dass die derzeitigen Therapiemöglichkeiten zu keiner suffizienten Reparatur von chondralen Defekten geführt haben. Aus der Vielzahl der experimentellen in vivo und in vitro Studien lässt sich die Möglichkeit einer Knorpelinduktion aus Vorläuferzellen erkennen. Den besten Ansatz bieten dabei die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Aufgrund der Komplexität des Umdifferenzierungsprozesses dieser Zellen ist die Schaffung von optimalen physikalischen, chemischen und biologischen Bedingungen derzeit eine große Herausforderung der Wissenschaft. Die Nutzung von dreidimensionalen Trägerkonstrukten zeigt einen Vorteil, da Zellen hier ein Lager finden, welches Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung erlaubt. Werden die Trägerkonstrukte in vivo verwendet, bieten sie zudem eine belastungsstabile Situation während der Proliferationsphase und ermöglichen durch langsame Degradation eine mechanische Induktion in der Differenzierungsphase. Des weiteren differenzieren die Zellen an ihrem endgültigen Bestimmungsort und können sich auf diese Weise an die lokalen mechanischen Gegebenheiten anpassen und ein faserarchitektonisch belastungsstabiles Regenerat bilden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, ein Implantat zu konstruieren, welches Proliferation und Differenzierung von Zellen ermöglicht und eine Induktion von hyalinem Knorpel durch mechanische Belastung zulässt.

Das Implantat sollte deshalb folgende Anforderungen erfüllen:

1. Es sollte ein resorbierbares biokompatibles Implantat sein, dessen Abbauprodukte keine inflammatorische Reaktion auslösen.
2. Eine Offenporigkeit sollte gegeben sein, um einen temporären Ankerplatz für Zellen bereit zu stellen und die Diffusion von Nährstoffen und Abbauprodukten zu gewährleisten.
3. Das dreidimensionale Implantat sollte ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis aufweisen, um maximalen Platz für Zelladhäsion, Proliferation und Matrixproduktion zu liefern.

4. Die Implantatoberfläche sollte an die Gelenkoberfläche angepasst werden, da Inkongruenzen Druckspitzen induzieren, welche möglicherweise die Induktion von Knorpel verhindern.

Nach Konstruktion geeigneter Implantate, im weiteren „Bioimplantate“ genannt, sollte anhand einer tierexperimentellen Studie gezeigt werden, dass mittels dieser resorbierbaren Bioimplantate durch mechanische Induktion eine Regeneration von chondralen Defekten durch hyalinen Knorpel möglich ist. Des weiteren sollte nachgewiesen werden, dass die Regeneration durch Zellen aus dem Knochenmark erfolgt und somit eine intraoperative Anreicherung dieser Zellen im Implantat rechtfertigt.

2. Material und Methodik

2.1 Das Bioimplantat

2.1.1 Herstellung und Konstruktion des Bioimplantates

Das verwendete Bioimplantat wurde so konstruiert, dass eine weiche Knorpelersatzschicht den chondralen Defekt vollständig ausfüllt. Mittels resorbierbarer Stifte (Darts) war zu garantieren, dass dieses im subchondralen Knochen sicher verankert wird.

Über eine „pressfit“-Verankerung war davon auszugehen, dass die Verankerungslöcher vollständig durch die Darts verschlossen werden.

Um dieses Ziel zu erreichen wurde ein dreidimensionales Vlies aus Polyglykolid (PGA) mit 14µm Filamenten, 8 mm Durchmesser und 1,5 bis 2mm Dicke als Knorpelersatzschicht verwendet (Abb.4). Die Vliese wurden in einem speziellen Spinnfaservlies-Verfahren hergestellt (ITV Denkendorf, Deutschland). In vitro Versuche zeigten einen 50% Masseabbau der Vliese nach 13 bis 14 Wochen und ein Stabilitätsverlust von 50% nach 1 Woche. Zur Verankerung im subchondralen Knochen dienten Darts aus Polylactid LDL Co 70/30 mit einer Länge von 8,7mm, einem Durchmesser von max. 1mm und einer Resorptionszeit von 1 ½ bis 2 Jahren. Bei diesem Material handelt es sich um ein Co-Polymer aus 70% L-Lactid und 30% DL-Lactid. Die Anheftung der Darts an die Knorpelersatzschicht wurde über Wärmezufuhr erzeugt. Das verschweißen der Dartköpfe mit dem Spinnfaservlies wurde bei einer Temperatur von 150°C, einer Anpresskraft von 1,5 kg und einer Kontaktzeit von ca. 4 Sekunden durchgeführt. Anschließend erfolgte die Sterilisation mit Ethylenoxid.



Abb.4: Bioimplantat

2.1.2 Schaffung der Knorpeldefekte und Verankerung der Bioimplantate

Für die Schaffung der Knorpeldefekte und der festen Verankerung der Bioimplantate wurden spezielle Instrumente verwendet. (Braun Aesculap AG & Co KG. , Tuttlingen)

Zunächst erfolgte das Setzen des Knorpeldefektes mittels einer 8mm Konkavfräse, dessen zentraler Führungsdorn ein Verrutschen während des Fräsvorganges verhinderte (Abb.5). Korrespondierend zur Gelenkfläche erhielt der Fräser eine konkave Oberflächengeometrie. Auf diese Weise konnte der Knorpel im Defektbereich vollständig entfernt werden, ohne dabei die subchondrale Platte zu durchbrechen. Bei den Leerlöchern der Vergleichsgruppe wurde ein Fräser ohne zentralen Führungsdorn verwendet, um ein Einwandern von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmarksraum zu verhindern.

Danach erfolgte das Einschlagen der Verankerungslöcher unter Zuhilfenahme eines 5 dornigen Schlaginstrumentes, wobei der zentrale Dorn als Führung in das zentrale Bohrloch des Konkavfräasers eingebracht wurde. Die Anordnung der restlichen 4 Dorne entsprach den Darts des Bioimplantates.

Die Konstruktion eines speziellen Fassinstrumentes erleichterte das exakte Einbringen des Bioimplantates in die Verankerungslöcher. Abschließend wurde

eine „press-fit“ Arretierung des Bioimplantates mittels Konkavstößel, der sich optimal der Gelenkfläche anpasste, durchgeführt.

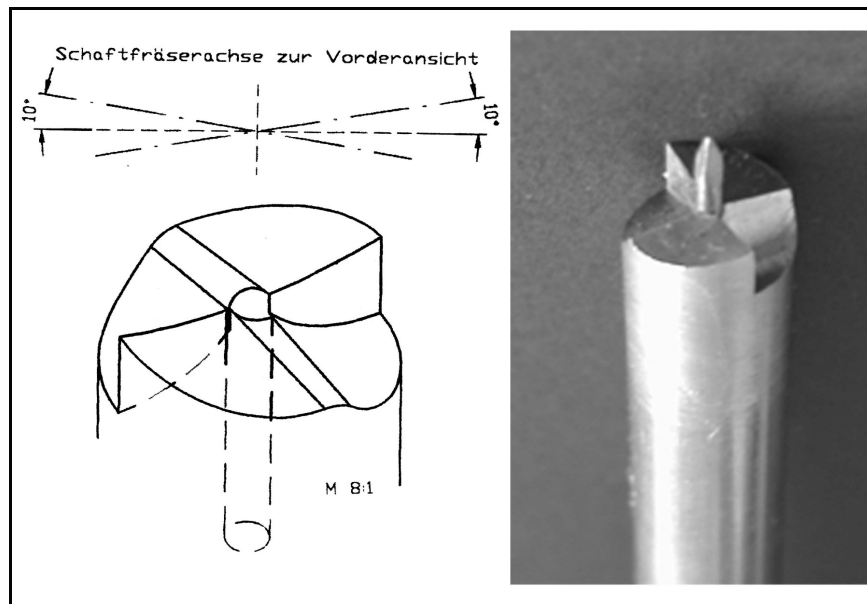


Abb.5: Instrument zum Fräsen von chondralen Defekten. Die Oberflächengeometrie wurde an die Gelenkfläche angepasst. Für die Implantatgruppe wurde zentral ein Führungsdorn eingesetzt, bei der Kontrollgruppe wurde ohne Führungsdorn gefräst.

2.2 Experimentelles Design

2.2.1 Genehmigung des Tierversuchsvorhabens

Dem Tierversuch ging ein Antrag auf Genehmigung nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes beim Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern, Thierfelder Str. 18, 18059 Rostock voraus und wurde unter der Versuchsnummer (LVL-MV 310-4/7221.3-1.1-014/02) genehmigt. Als verantwortlicher Leiter des Versuchsvorhabens fungierte Dr. med. Peter E. Müller (Orthopädische Klinik und Poliklinik, Universität Rostock, Ulmenstraße 44/45, Postfach 10 08 88, 18055 Rostock).

Des weiteren wurde das Forschungsprojekt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Förderkennzeichen 01 EZ0205 gefördert.

2.2.2 Tiermodell

Die Versuche wurden an ausgewachsenen ca. 1 Jahr alten und ca. 60 kg schweren weiblichen Merinoschafen (Schäfer Herr Scharf, Volkenshagen, Mecklenburg Vorpommern, Deutschland) durchgeführt.

Das Schaf ist wie der Mensch ein langsamer Knorpel- und Knochenbildner und besitzt daher einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem Kaninchen.⁸⁸

Im Gegensatz zum Hund erlaubt die meist stehende Lebensweise des Schafes eine bessere mechanische Belastung des Bioimplantates zur Induktion von Knorpel. Zusätzlich ermöglicht die Größe des Schafkniesgelenks ein präziseres Einbringen von oberflächenpaßgenauen Bioimplantaten in den Defekt. Die Beschränkung auf lediglich weibliche Schafe lag in Gründen der Kohabitations- und sozialer Konfliktvermeidung.

Insgesamt wurden 2 Versuchsgruppen gebildet. Auf eine Kontrollgruppe (Gruppe 1) konnte verzichtet werden, da hier auf Ergebnisse der Kontrollgruppe einer vorrangegangenen Versuchsreihe unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson (Az 211-2531-97/99 bei der Bezirksregierung Oberbayern) zurückgegriffen werden konnte.

Für die chondralen Defekte wurde der lasttragende Bereich der medialen Femurkondyle des linken Beines gewählt. Aus Gründen des Tierschutzrechtes wurden bereits in der vorangegangenen Versuchsreihe zur Einsparung von Versuchstieren zwei Defekte in der Femurkondyle von der Regierung Oberbayerns gefordert. Auf diese Weise konnte die Versuchsgruppengröße von n=6 auf drei Tiere pro Versuchsgruppe reduziert werden. Durch die Schaffung von 2 Defekten mit einer Durchmessergröße von 8mm im Abstand von 5 mm wurde nahezu der gesamte lasttragende Bereich des medialen Kniegelenkkompartments eingenommen.

2.2.3 Narkoseverfahren

Präoperativ erfolgte bei allen Tieren eine veterinärmedizinische Untersuchung. Nur gesunde Tiere wurden so in die Versuchsreihe aufgenommen. Die präoperative Nüchternphase der Versuchsschafe betrug 36 Stunden. Wasser stand ad libitum bis 12 Stunden vor Narkoseeinleitung zur Verfügung.

Die Narkose erfolgte durch eine intramuskuläre Kombinations-Injektion von Diazepam (Diazepam-Ratiopharm®, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland, 10mg/100kg KG), Xylazin (Rompun®, Bayer GmbH, Leverkusen, Deutschland, 20mg/100kg KG) und Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland, 1500mg/100kg KG). Die für eine ca. 45 minütige Kurznarkose erforderlichen Kriterien der Hypnose und Analgesie waren somit gewährleistet. Sofort nach Narkosebeginn wurde 100%er Sauerstoff (5l/min) über eine Nasensonde appliziert. Auf eine Intubation konnte bei diesem Narkoseverfahren verzichtet werden. Um eine eventuelle Aspiration von Speichel und regurgitiertem Pansensaft zu verhindern, wurde auf eine fortdauernde korrekte Kopf- und Oberkörperhochlagerung geachtet. Die perioperative Überwachung der Vitalparameter und Narkosetiefe erfolgte durch regelmäßige Atem- und Pulskontrolle durch einen Veterinärmediziner.

Intraoperativ erhielten die Tiere eine Amoxicillin- und Clavulansäure-Antibiose s.c. (Augmentan® 2,2g/55ml NaCl, SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland) zur Infektionsprophylaxe.

Noch auf dem Operationstisch wurde zur sicheren Weiterführung der Analgesie über das Narkoseende hinaus die Gabe von Buprenorphinhydrochlorid i.m. (Temgesic® 0,324mg, Essex Pharma, München, Deutschland) durchgeführt. Die anschließende Aufwachphase verbrachten die Schafe unter veterinärmedizinischer Überwachung in Einzelboxen mit Stroheinlage. Das Erwachen erfolgte bei allen Tieren problemlos in einem Zeitraum von 45-60 Minuten nach Narkosebeginn. Alle Tiere konnten ca. eine Stunde nach Operationsende sicher auf den Beinen stehen.

Postoperativ erhielten die Tiere nach 6, 12 und 24 Stunden 0,324mg Buprenorphinhydrochlorid i.m. zur Schmerzstillung. Weitere Schmerzmittelgaben wurden je nach klinischer Schmerzsymptomatik, kontrolliert anhand von Schmerzzeichen, wie Zähneknirschen, Lautäußerungen, Pressen gegen die Stallwand und fehlendem Fress- und Sozialverhalten, verabreicht. Wasser und Nahrung stand ad libitum sofort nach Operationsende zur Verfügung.

Am Ende des Versuchszeitraumes wurde eine intravenöse Euthanasie mit 20ml Pentobarbital (Narcoren® 16g/100ml; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) und 20ml KCl (1M Kaliumchlorid-Lösung Pfimner, Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) durchgeführt.

2.2.4 Operationstechnik

Die Lagerung der Tiere erfolgte direkt nach Narkosebeginn auf der rechten Seite mit einer Kopf- und Oberkörperelevation von ca. 30°. Das linke Hinterbein wurde im Hüftgelenk in maximaler Abduktion und im Kniegelenk in maximaler Beugung fixiert. Es folgte die Rasur und Entfettung des linken Kniegelenkbereiches. Anschließend wurde das Operationsgebiet mit Povidon-Jod (Braunol® 2000 Lösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und durch einen steril gekleideten Operateur und einem Assistenten mit einem Arthroskopielochtuch und einer Inzisionsfolie abgedeckt.

Der operative Zugang erfolgte durch einen ca. 4-5cm langen geraden Hautschnitt über dem medialisseitigen Kniegelenk. Durch Spaltung des Retinaculum patellae mediale in Längsrichtung und Lateralluxation der Patella konnte die mediale Femurkondyle exploriert werden. Nun erfolgte das Setzen eines anterioren und

eines posterioren Knorpeldefektes im Abstand von 5mm im lasttragenden Bereich mit dem 8mm Konkavfräser. Dabei wurde darauf geachtet, die subchondrale Schicht zu erhalten.

Vor dem schichtweisen Verschluss der Gelenkkapsel und Haut mit resorbierbaren 2-0 Vicryl-Einzelknopfnähten (Marlin®, Catgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland) wurde bei jedem Tier eine gründliche Spülung des Kniegelenkes mit NaCl durchgeführt. Die Wunde wurde anschließend mit Pflasterspray (Nobecutan Spray®, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland) besprüht und mit einem sterilen Verband abgedeckt. Zur Kontrolle wurden die Kniegelenke postoperativ noch in Narkose durchbewegt. Die Operationsdauer lag zwischen 30-50 Minuten.

2.2.4.1 Gruppe 1: Leerloch

Bei der Leerlochgruppe wurde mit dem Konkavfräser ohne zentralen Führungsdorn der Knorpel bis zur subchondralen Schicht entfernt. Um thermische Schäden zu vermeiden erfolgte während des Fräsens eine Kühlung mit NaCl-Lösung. Die so geschaffenen anterioren und posterioren 8mm Defekte wurden nach gründlicher Spülung mit NaCl, um die Knorpelreste des Fräsvorganges zu beseitigen, im Weiteren unbehandelt belassen.

2.2.4.2 Gruppe 2: Bioimplantat

In der Bioimplantatgruppe erfolgte das Setzen des Knorpeldefektes durch den Konkavfräser mit zentralem Führungsdorn. Nach anschließender sorgfältiger Spülung mit NaCl wurden Verankerungslöcher mit dem Schlagdorninstrument angelegt. Nun konnte mit Hilfe des Fassinstrumentes das Bioimplantat in die Verankerungslöcher eingebracht und durch Aufschlagen mit dem Stößel eine endgültige Arretierung erreicht werden (Abb.6).

In einigen Fällen gelang es aus Instabilitätsgründen der Darts nicht, diese vollständig in den Verankerungslöchern zu versenken. Alle Bioimplantate schienen jedoch fest im Defekt verankert.

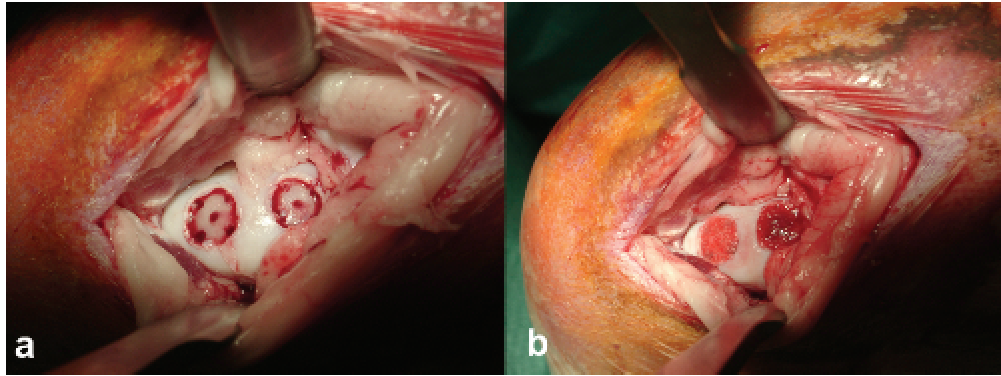


Abb.6: Intraoperativer Situs nach Setzen der Defekte und anschließendem Einschlagen der Verankerungslöcher (a). Die eingesetzten Bioimplantate passen sich optimal der Gelenkfläche an. Die Verankerungsarts sind unter dem Implantat noch zu erkennen (b).

2.2.4.3 Gruppe 3: Bioimplantat plus Fibrin und Zellanreicherung

In dieser Gruppe erfolgte nach dem Fräsvorgang zunächst die Aspiration von 1-2 ml Knochenmark mittels Kanülierung des zentralen Bohrloches. Anschließend wurde auf gleiche Art und Weise wie in Gruppe 2 das Bioimplantat eingebracht und arretiert.

Zum Einbringen des Fibrin-Thrombin-Knochenmarkgemisches verwendeten wir ein Doppelspritzensystem (Beriplast, Fa. Aventis, Frankfurt, Deutschland), welches eine gleichmäßige Auftragung gewährleistete. Dabei wurde in einer Spritze das Fibrin mit Knochenmark im Verhältnis 1:1 gemischt, in der zweiten Spritze befand sich das Thrombin im Verhältnis 1:2 zum Fibrin-Knochenmarkgemisch. Vor dem Verschluss der Gelenkkapsel erfolgte eine Aushärtephase der Komponenten von 1-2 Minuten. Intraoperativ stellte sich eine gleichmäßige Vernetzung des Bioimplantates mit dem Fibrin-Thrombin-Knochenmarkgemisch dar (Abb.7).

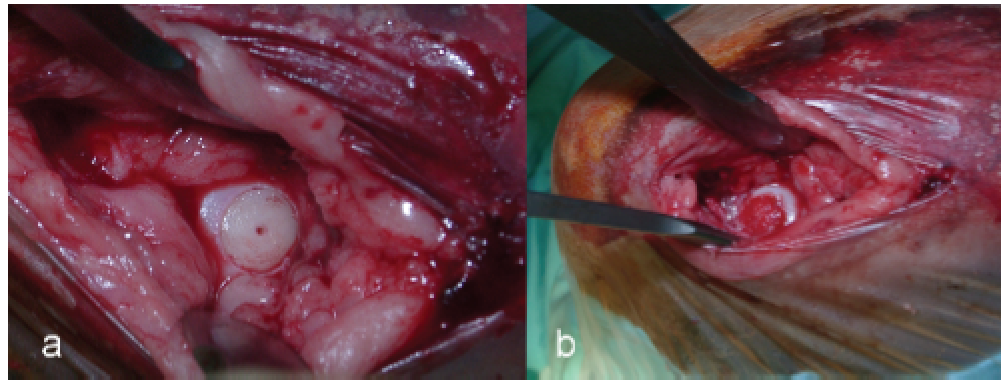


Abb.7: Deutlich zu Erkennen ist die homogene chondrale Läsion mit dem zentralen Bohrloch aus dem nach Kanülierung die Aspiration von 1-2ml Knochenmark erfolgte (a). Situs nach Implantation des Bioimplantates und Zellanreicherung. Das Bioimplantat erscheint durch die Zellanreicherung dunkelrot und glasig (b).

2.2.5 Postoperative Phase und Tierhaltung

Alle Tiere wurden mit Ohrplomben gekennzeichnet. Postoperativ verblieben die Schafe für 2 Stunden in einer Einzelbox, danach erfolgte die Haltung zu dritt in einem 16m² großen Auslauf mit Strohbelaag unter Aufsicht eines geprüften Tierpflegers für weitere 3 Tage. In dieser Phase wurden die Tiere täglich bezüglich Wundsituation und Laufverhalten visitiert. Die Tiere erhielten die übliche Stallnahrung über Pellets und Wasser ad libitum.

Ab dem 4. postoperativen Tag konnten alle Schafe in eine artgerechte Stallhaltung mit 20 Tieren auf 160m² verbracht werden. Regelmäßige Visiten zeigte bei allen Tieren eine Vollbelastung der operierten Extremität ab dem 2. postoperativen Tag. Lediglich bei einem Schaf der Gruppe 2 kam es erst ab der 7. postoperativen Woche zur Vollbelastung. Klinisch gab es bei diesem Tier keinen Anhalt für einen Infekt. Die passive Beweglichkeit der betroffenen Extremität war nicht eingeschränkt und auf zusätzliche Schmerzmittelgaben kam es zu keiner Besserung der Symptomatik. Zytologisch ließ sich nach Ende des Versuchszeitraumes aus der Synovialflüssigkeit eine aseptische Entzündung nachweisen. Somit wurde das Tier aus der Versuchsgruppe ausgeschlossen.

Alle anderen Tiere blieben bezüglich Wundinfekten oder anderen Erkrankungen über den gesamten Versuchszeitraum unauffällig.

2.3 Anfertigung der Histologien

Nach Vollendung der 12. postoperativen Woche erfolgte die Euthanasie der Tiere. Das Kniegelenk wurde mit einem Abstand von ca. 5cm zur Gelenkfläche reseziert. Es folgte die sorgfältige Präparation der operierten Femurkondyle und des korrespondierenden Tibiaplateaus. Nach Reinigung der Präparate mit NaCl und Fotodokumentation wurden alle Defekte mit einer Minihandsäge in 1cm x 1cm x 1cm Quader ausgesägt. Besondere Beachtung galt dabei dem Defektbereich, welcher durch das Sägen nicht beschädigt werden durfte.

Es folgte die Entwässerung der Präparate in 100% Methanol für 2 Tage. Anschließend wurden die Präparate in 5%-ige EDTA-Lösung (25g Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Purum (>97%) auf 500 ml Aqua dest.) über 6 Wochen entkalkt. Diese Lösung wurde in den ersten zwei Wochen bei Lagerung im Kühlschrank (4°C) alle 3 Tage und in den weiteren 4 Wochen wöchentlich gewechselt. Vor dem Anfertigen der Schnitte wurden die Präparate zum Zellschutz vor der Weiterverarbeitung für 24 Stunden in 5%-ige Saccharose (5g D(+)-Sucrose in 100ml PBS) überführt. Anschließend erfolgte das Schockfrieren für 30 Minuten bei -27°C mittels eines Gels auf den dafür vorgesehenen Trägern, sowie das Schneiden in 10µm Schnitte mit einem Kryomikrotom (Microm HM 500 OM-Kryomikrotom). Die Präparate wurden von zentral nach lateral geschnitten, wobei mindestens 40 Schnitte angefertigt und auf histologischen Objektträgern bei -20°C für 2 Wochen fixiert wurden.

Zur morphologischen Beurteilung erfolgte die Anfertigung von Übersichtsfärbungen mit Mayerschem Hämatoxylin-Eosin, Safranin-O mit Gegenfärbung mit Echtgrün und Weigertschem Eisenhämatoxylin, sowie Toloidin-Blau. Zum Nachweis der gewebspezifischen extrazellulären Matrix wurden immunhistochemische Färbungen für von Kollagen I, Kollagen II und Aggrecan durchgeführt.⁸³

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin

Die ausgewählten Schnitte wurden für 3 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer (Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland) überführt und anschließend für 5

Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach einer Verweildauer von 90 Sekunden in 1% Eosin G (Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland) und Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 Fraktionen 96% ETOH, 100% ETOH und Xylol) erfolgte das Eindecken und Lufttrocknen der Präparate.

2.3.2 Toloidin-Blau

Die Toloidin-Blau-Färbungen wurden durch Färben der Schnitte in ToloidinblauO (Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland) für 30 Sekunden und anschließender Differenzierung in Leitungswasser mit einem Tropfen 100% ETOH erreicht. Es folgte das Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Eindecken der Schnitte.

2.3.3 Safranin-O

Hier erfolgte zunächst die Überführung in Weigertsches Eisenhämatoxylin (Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland) für 7 Minuten. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten fließend gewässert und für weitere 5 Minuten in 0,02% Echtgrün (0,02g FCF (Echtgrün Chroma Nr. IA304) auf 100ml Aqua dest., Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gegengefärbt. Nach Überführung in Essigsäure (Eisessig) für 15 Sekunden und kurzem Abspülen mit Aqua dest. erfolgte die zweite Gegenfärbung mit 0,1% Safranin-O (0,1g Safranin-O (Chroma Nr. IB463) auf 100ml Aqua dest., Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 5 Minuten. Nun wurden die Schnitte erneut kurz mit Aqua dest. abgespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit je zwei Fraktionen entwässert und eingedeckt.

2.3.4 Kollagen I und Kollagen II

Zum immunhistochemischen Nachweis von Kollagen-I wurde der Col I-Antikörper 1:2000 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und von Kollagen-II der Col II-CI-Antikörper 1:6 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwandt. Zunächst wurden alle Präparate auf dem Objektträger mit einem Dakostift umkreist und mit PBS-Tween (9g/l NaCl, 0,32g/l Natriumdihydrogenphosphat, 1,42g/l di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 0,05 Vol% Tween) für 5

Minuten rehydriert. Mittels Methanol/H₂O₂ (100ml Methanol und 1ml 30% Wasserstoffperoxyd) erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase und Fixation. Anschließend wurde für 4x5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Um eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu ermöglichen, mussten die Epitope zunächst freigelegt werden. Dieses wurde durch enzymatische Andauung mit Hyaluronidase 3U/l und Chondroitinase ABC 0,5U/l (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer erreicht. Nach erneutem Waschen für 3x5 Minuten mit PBS-Tween wurden durch das einstündige Aufbringen von verdünntem Pferdeserum im Verhältnis 1:20 in PBS-Tween (Vector Laboratories, Burlingame, USA) unspezifische Bindungsstellen geblockt. Nun erfolgte die Inkubation mit den o.g. Primärantikörpern und nach erneutem Waschvorgang die Inkubation mit einem Sekundärantikörper 1:200 (VectastainABC-Kit Elite Anti-Maus, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für je 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Negativkontrollen wurden mit PBS-Tween durchgeführt. Einem weiteren Waschvorgang schloss sich das Aufbringen des ABC-Komplexes (Avidin-Biotin-Komplex) für 30 Minuten an. Im letzten Schritt wurden die Präparate für 4 Minuten unter Lichtabschluss in DAB (Diaminobenzidin, Vector Laboratories, Burlingame, USA) überführt und nach kurzem Abspülen unter fließendem Leitungswasser mit Hämatoxylin nach Mayer (Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland) für 20 Sekunden gefärbt. Nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-80%-90%-2x100%ETOH und 2xXylol je 5 Minuten) erfolgte das Eindecken der Präparate.

2.3.5 Aggrecan

Zum ermöglichen der Aggrecan-Antikörperreaktion mussten die Präparate zunächst durch einen Reduktions- und Alkylierungsschritt vorbereitet werden. Die Reduktion erfolgte für 2 Stunden in DTT 10mM (100 ml Puffer + 0,154g 1,4 Dithiothreitol (Boehringer Mannheim, Deutschland)). Als Puffer wurde 50 mM Tris + 200 mM NaCl verwendet, welcher vorher mittels HCl auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt wurde. Im zweiten Schritt erfolgte die Stabilisierung der im Reduktionsschritt gebrochenen Disulfidbrücken durch Alkylierung mit 40 mM Iodoacetamid (100ml PBS + 0,74g Iodoacetamid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)). Der immunhistochemische Nachweis von Aggrecan wurde mit

dem 1C6-Antikörper durchgeführt. Die Methodik erfolgte dabei simultan zum Kollagen-I und -II Nachweis.

2.4 Makroskopische- und mikroskopische Beurteilung

Die makroskopische Beurteilung der Defekte beinhaltete 4 Aspekte. Neben der Art des Oberflächengewebes wurde zusätzlich die Anbindung an den gesunden Knorpel und die Oberflächenkongruenz beurteilt. Mittels einer dafür vorgesehenen Schablone und entsprechender optischer Vergrößerung wurde die prozentuale Deckung der Defekte mit kartilaginärem Regeneratgewebe bestimmt. Zur histologischen Beurteilung wurde als Grundlage der Score nach O'Driscoll^{92,101} verwendet. Da dieser Score keine immunhistochemischen Nachweismethoden, das Vorhandensein von Gefäßen und die Metachromasie bei Toluidin-Blau-Färbungen berücksichtigt, erweiterten wir den Score mit zusätzlichen Kriterien (Tabelle 1). Bezüglich der Lokalisation des zu beurteilenden Gewebes wurde von O'Driscoll keine exakte Definition angegeben. In standardisierten Schnitten durch die Mitte des Defektes wurde daher das minderwertigste Gewebeareal für die Bewertung herangezogen. Die Auswertung erfolgte verblindet und zusätzlich zur Eigenen durch einen unabhängigen Histologen.

Resorbierbare Bioimplantate zur Regeneration von chondralen Defekten in einer tierexperimentellen Studie am Schaf

Art des vorherrschenden Gewebes	<u>Zellmorphologie</u>	Punkte
	Hyaliner Gelenkknorpel	4
	Unvollständig differenziertes Mesenchym	2
	Bindegewebe oder Knochen	0
	<u>Anfärbbarkeit der Matrix mit Safranin-0</u>	
	Normal oder fast normal	3
	Mittel	2
Strukturelle Charakteristika	Schwach	1
	Keine	0
	<u>Gleichmäßigkeit der Oberfläche</u>	
	Glatt und intakt	3
	Oberflächlich horizontale Schichtung	2
	Risse – 25 bis 100 Prozent der Dicke	1
	Schwere Störung, einschließlich Fibrillation	0
	<u>Strukturelle Integrität</u>	
	Normal	2
	Leichte Störung, einschließlich Zysten	1
	Schwere Zerstörung	0
	<u>Dicke</u>	
	100 % des angrenzenden normalen Knorpels	2
	50 – 100 % des normalen Knorpels	1
	0 - 50 % des normalen Knorpels	0
Freiheit von zellulären Degenerationszeichen	<u>Verbindung mit angrenzendem Knorpel</u>	
	An beiden Enden des Implantats angebunden	2
	An einem Ende oder an beiden Enden teilweise angebunden	1
	Nicht angebunden	0
	<u>Zellularität</u>	
	Normale Zellzahl	3
	Leichte Hypozellularität	2
	Mittelschwere Hypozellularität	1
	Schwere Hypozellularität/Hyperzellularität	0
	<u>Bildung von Chondrozytenclustern</u>	
	Keine Cluster	2
	< 25 % der Zellen	1
	25 – 100 % der Zellen	0
	<u>Freiheit des angrenzenden Knorpels von deg. Erscheinungen</u>	
	Normale Zellzahl, keine Cluster, normale Anfärbbarkeit	3
	Norm. Zellzahl, leichte Clusterbildung, mittl. Anfärbbarkeit	2
	Leichte o. mittelschwere Hypozell., schwache Anfärbbarkeit	1
	Schwere Hypozellularität, schlechte o. keine Anfärbbarkeit	0

Resorbierbare Bioimplantate zur Regeneration von chondralen Defekten in einer tierexperimentellen Studie am Schaf

Erweiterung	<u>Anwesenheit von Kollagen-I</u>	
	Kein Nachweis von Kollagen-I	2
	Kollagen-I in Teilen des Regenerates	1
	Kollagen-I im ganzen Regenerat oder knöchernen Oberfläche	0
	<u>Anwesenheit von Kollagen-II</u>	
	Kollagen-II im ganzen Regenerat	2
	Kollagen-II in Teilen des Regenerates	1
	Kein Nachweis von Kollagen-II oder knöchernen Oberfläche	0
	<u>Anwesenheit von Aggrecan</u>	
	Aggrecan im ganzen Regenerat	2
	Aggrecan in Teilen des Regenerates	1
	Kein Nachweis von Aggrecan oder knöchernen Oberfläche	0
	<u>Blutgefäß im Regenerat</u>	
	Keine Gefäße sichtbar	2
	Gefäße ohne Kontakt zur Gelenkoberfläche	1
	Gefäß mit Kontakt zur Gelenkoberfläche	0
	<u>Metachromasie bei Toloidin-Blau</u>	
	Vorhanden	2
	Nicht überall vorhanden	1
	Nicht vorhanden	0
Gesamt max.		34

Tab.1: Modifizierter Score nach O'Driscoll

2.5 Statistische Auswertung

Die Angaben der Daten erfolgt in Mittelwerten \pm Standardabweichung. Der Einsatz von verteilungsfreien Tests war aufgrund des sehr kleinen Umfangs von Stichproben notwendig. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede wurde als nichtparametrischer Test zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben die Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis verwendet, wobei das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Intra- und postoperativer Verlauf

Der geplante postoperative Versuchszeitraum von 12 Wochen konnte bei allen Tieren eingehalten werden.

Intraoperativ erwies sich die Verankerung der Bioimplantate als schwierig. Aufgrund der mechanisch instabilen Eigenschaften des Bioimplantates konnten nicht in allen Fällen die Darts optimal in den dafür vorgesehenen Löchern positioniert werden. Teilweise musste ein einzelner Dart entfernt werden, in anderen Fällen standen auch Darts gering über der Defektebene. Dennoch schienen alle Bioimplantate fest in den Defekten verankert, allerdings war die Oberfläche durch überstehende Darts inkongruent.

Der postoperative Verlauf gestaltete sich bei allen Tieren, bis auf das bereits unter 2.2.5 genannte Tier der Gruppe 2, komplikationslos. Dieses Tier der Gruppe 2 wurde aus der Versuchsgruppe ausgeschlossen. Die Wundheilung verlief bei allen Tieren per primam. Es kam bei keinem Tier zu einer nennenswerten Ergußbildung. Teilweise zeigten die Tiere bis zum 2. postoperativen Tag ein Schonhinken. Im restlichen Versuchszeitraum liefen die Tiere mit unauffälligem Gangbild. Auch Schmerzzeichen, wie Zähneknirschen oder fehlendes Fress- und Sozialverhalten traten nicht auf. Im postoperativen Verlauf war kein Unterschied zwischen der Leerlochgruppe und den Bioimplantatgruppen festzustellen.

3.2 Makroskopische Beurteilung

3.2.1 Gruppe 1: Leerloch

Die Ergebnisse der Kontrollgruppe konnten aus einer vorrangegangenen Versuchsreihe unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson (Az 211-2531-97/99 bei der Bezirksregierung Oberbayern) übernommen werden.

Die chondralen Defekte ohne Versorgung mit einem Bioimplantat wiesen am Ende des Versuchszeitraumes in allen Fällen eine Knorpelglatze auf (Abb.8). Ein Regeneratgewebe war makroskopisch nicht erkennbar. Die Übergänge zum gesunden Knorpel am Defektrand waren unregelmäßig ausgeweitet und zeigten Risse in verschiedenen Schweregraden. Auf dem korrespondierenden Tibiaplateau waren leichte Schleifartefakte sowie beginnende Arthrosezeichen nachweisbar.



Abb.8: Leerlochkontrolle eines chondralen Defektes. Die Bildung eines Regeneratgewebes ist nicht zu erkennen. Es besteht eine Knorpelglatze.

3.2.2 Gruppe 2: Bioimplantat

Alle Knorpeldefekte nach Versorgung mit einem Bioimplantat zeigten nach 12 Wochen eine durchschnittliche Defektdeckung von 75% mit einem Regeneratgewebe. Makroskopisch fiel dabei insbesondere die unregelmäßige

Oberflächenstruktur des teilweise bindegewebig und teilweise knorpelähnlich erscheinenden Gewebes auf (Abb.9). In den Bereichen ohne Defektdeckung bestand eine Knorpelglatze. Auffällig war, dass die Regeneratbildung peripher im Defekt und um das zentrale Bohrloch flächendeckender erschien als in den restlichen Bereichen der chondralen Läsion. Weiterhin kam es in allen Fällen zu keiner Regeneratbildung direkt über dem zentralen Bohrloch. Die Anbindung des Regeneratgewebes an den gesunden Knorpel stellte sich generell gut dar, es waren makroskopisch keine Spalten im Anbindungsbereich und keine Risse im gesunden Knorpel zu erkennen. In einigen Fällen zeigten sich über die Regeneratfläche herausstehende Darts. Diese Befunde stimmten mit den Protokollen der intraoperativen Implantationsprobleme überein. Bei diesen Defekten ließen sich zusätzlich deutliche Schleifartefakte der Darts im korrespondierenden Tibiaplateau und Risse in den Menisci nachweisen (Abb.11). In allen anderen Fällen waren die Tibiaplateauflächen intakt und ohne Arthrosezeichen. Eine Korrelation zwischen ventralen und dorsalen Defekten konnte nicht gezeigt werden.

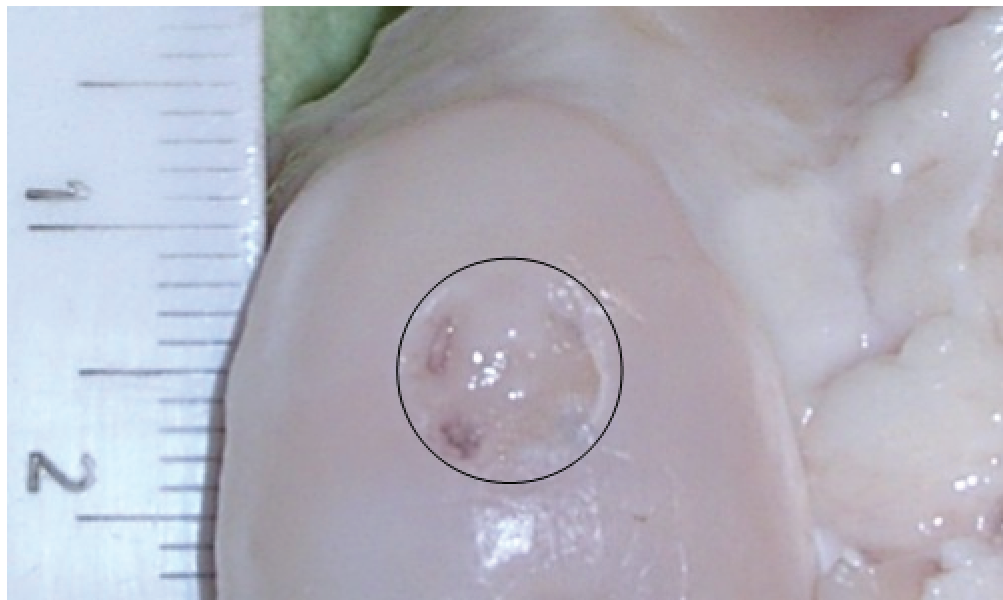


Abb.9: Makroskopisches Bild eines Regenerates nach Implantation eines Bioimplantates. Der durch den Kreis markierte ursprüngliche Defekt ist teilweise mit Knorpelgewebe unterschiedlicher Art gedeckt. Die für die Verankerung des Bioimplantates verwendeten Darts sind noch nicht vollständig resorbiert und schimmern durch eine dünne Regeneratschicht.

3.2.3 Gruppe 3: Bioimplantat plus Fibrin-Thrombin und Zellanreicherung

Die chondralen Defekte mit Bioimplantatversorgung und zusätzlicher Zellanreicherung in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch (FTZ) wiesen am Ende des zwölfwöchigen Versuchszeitraumes eine durchschnittliche Regeneratbildung von 75% auf (Abb.10). In dieser Gruppe lagen bei zwei Schafen die ventralen Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone, welches keinen wesentlichen Einfluß auf die prozentuale Deckung (72,33%) hat. Obwohl eine Lokalisation von ventralem und dorsalem Defekt in der Hauptbelastungszone generell keine Korrelation zeigt, ergaben sich im Rahmen der histologischen Auswertung des O'Driscoll-Scores ausgeprägte Unterschiede, wenn ein Defekt außerhalb der Hauptbelastungszone lag. Eine Lokalisation von Defekten außerhalb der Hauptbelastungszone wurde nicht als Ausschlusskriterium definiert, so dass die histologische Auswertung mit und ohne die zwei o.g. Defekte erfolgt.

Das Regenerat, welches makroskopisch teils bindegewebiger Narbe, teils Knorpel ähnlich war, zeigte auch hier eine unregelmäßige Oberflächenstruktur. Hier fiel insbesondere die Bildung grobscholliger Regeneratinseln innerhalb der Defekte auf, wobei die Anordnung der Inseln keine Einheitlichkeit erkennen ließ. Die zentralen Bohrlöcher waren alle mit einem Regeneratgewebe verschlossen und makroskopisch nicht mehr oder nur noch schlecht zu erkennen. Die Anbindung an den gesunden umgebenden Knorpel erschien in allen Fällen gut, es waren makroskopisch keine Spalten erkennbar. Bei einzelnen Präparaten zeigten sich auch hier über die Regeneratfläche herausstehende Darts, die wiederum den intraoperativen Implantationsproblemen entsprachen. Die korrespondierenden Tibiaplateaus wiesen in diesen Fällen dementsprechende Schleifartefakte und Risse in den Menisci auf, ansonsten stellten sich die Tibiaplateauflächen intakt und ohne nennenswerte Arthrosezeichen dar (Abb.11).

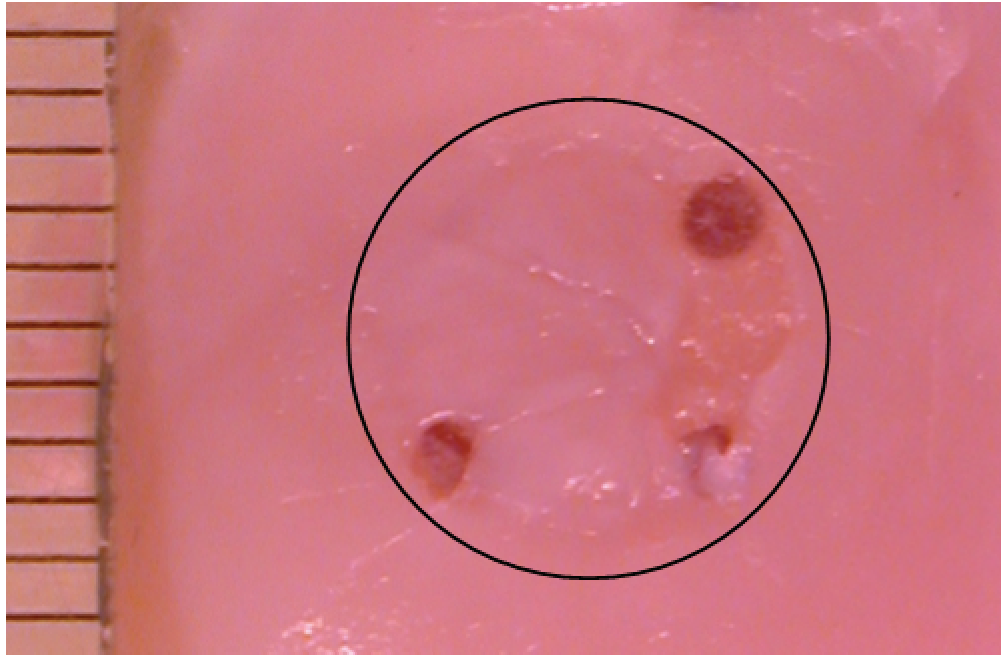


Abb.10: Makroskopisches Bild eines Regenerates nach Implantation eines Bioimplantates mit zusätzlicher Zellanreicherung in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch. Es besteht keine vollständige Deckung des Defekts. Die Oberflächenstruktur weist einzelne Fissuren auf und lässt noch nicht vollständig resorbierte Darts erkennen.

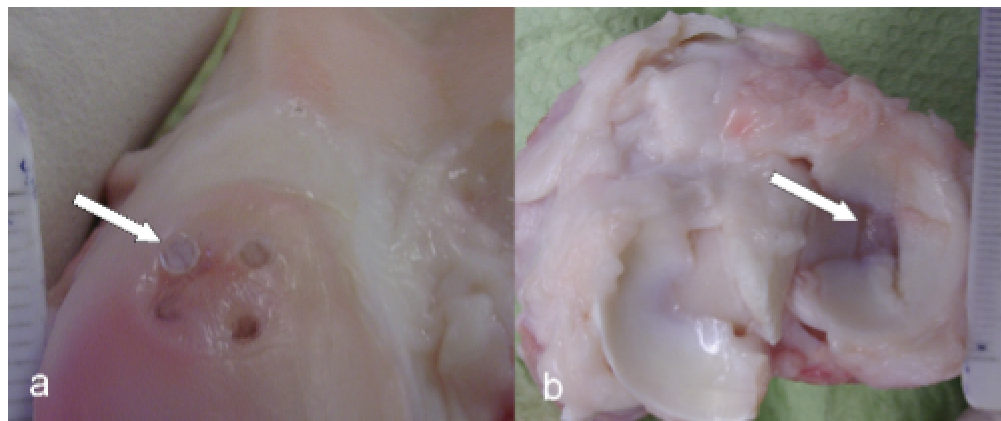


Abb.11: In (a) ist deutlich ein über dem Knorpelniveau stehender Dart zu erkennen, welcher zu Kratzspuren auf der korrespondierenden Gelenkfläche führte (b). Beachte auch die Druckspitzeninduzierte fehlende Regeneratbildung über den Darts.

3.3 Mikroskopische Beurteilung

3.3.1 Gruppe 1: Leerloch

Bereits im Übersichtspräparat ließ sich die fehlende Regeneration der Defekte erkennen (Abb.12). Lediglich im Randbereich fanden sich einige knorpelähnliche Regenerate, die 2% (1-5%) der Defekte überzogen (Abb.12 c und 14). Dieses Regeneratgewebe hatte jedoch morphologisch keine Ähnlichkeit mit hyalinem Knorpel. Im Bereich des sich daran anschließenden ehemals gesunden Knorpels außerhalb des Defektes waren in der oberen Gelenkschicht Fissuren, sowie eine deutliche Clusterbildung der Chondrozyten erkennbar. Weiterhin zeigte sich ein beginnender Proteoglykanverlust mit gleichzeitiger Kollagen-I-Bildung als Hinweis auf eine beginnende Degeneration (Abb.13). Die teilweise noch bestehende Tidemark ließ zusätzlich einzelne Gefäßeinsprossungen mit umgebender Knochenmanschette erkennen. Der restliche Defektbereich zeigte teilweise eine dünne Schicht von mineralisiertem Knorpel, welcher beim intraoperativen Fräsvorgang nicht vollständig entfernt wurde. Diese Restknorpelanteile wiesen einen starken Proteoglykanverlust als Zeichen der Degeneration auf. Neben diesen Anteilen waren bei allen Präparaten auch Bereiche erkennbar, an denen der subchondrale Knochen eröffnet wurde. Hier zeigte sich ein dünnes undifferenziertes bindegewebiges Regenerat.

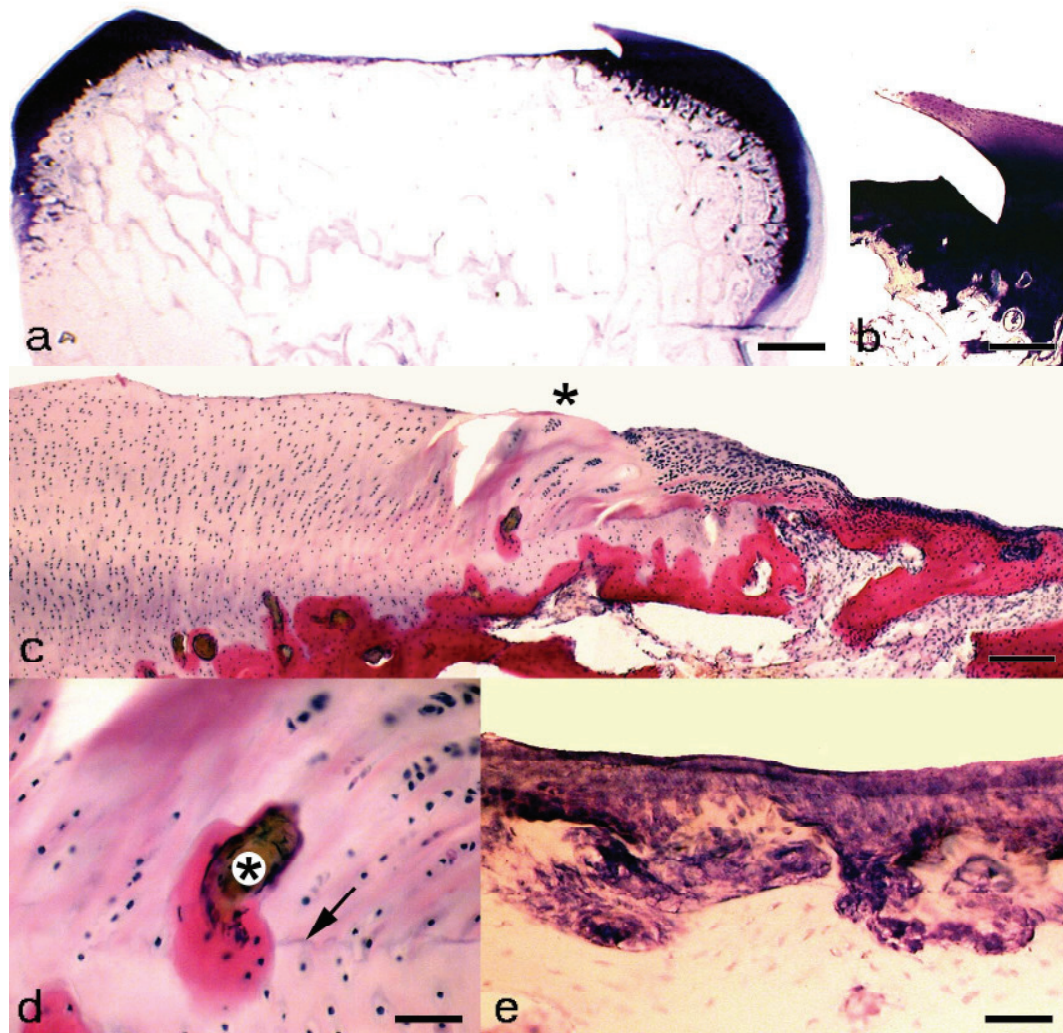


Abb.12: Histologie eines chondralen Defektes der Leerlochgruppe.

- a) Übersichtsaufnahme der medialen Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion ohne erkennbare Regeneratbildung. Der subchondrale Knochen ist unversehrt. Toloidin-Blau-Färbung, Referenzstrecke 1,3mm.
- b) Detailaufnahme aus a). Beginnender Proteoglykanverlust in der oberen Gelenkknorpelschicht im Randbereich des Knorpeldefektes (Verlust der Anfärbbarkeit mit Toloidin-Blau). Referenzstrecke 360 μ m.
- c) Die hochauflösende Rekonstruktion der Randzone des oberflächlichen Knorpeldefektes zeigt deutlich den Übergang vom gesunden Gelenkknorpel (linker Bildrand) zum destruierten Bereich der Defektzone (rechter Bildrand). In dieser Übergangszone ist ein Regeneratgewebeareal (*) zu erkennen, welches histomorphologisch deutliche Abweichungen zum normalen Gelenkknorpel aufweist. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 180 μ m.
- d) Detailaufnahme aus c). Im Randbereich des chondralen Defektes ist ein einsprossendes und von einer rot angefärbten Knochenmanschette umgebendes Blutgefäß (*) deutlich erkennbar. Diese Knocheneinsprossung durchbricht dabei die noch teilweise bestehende Tidemark (Grenze zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Knorpel, Pfeil). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 45 μ m.

- e) Oberfläche des Knorpeldefektes. Auf der ehemaligen subchondralen Knochenplatte imponiert eine dünne Schicht aus undifferenziert erscheinenden Bindegewebszellen. Toloidin-Blau-Färbung, Referenzstrecke 90 μm .

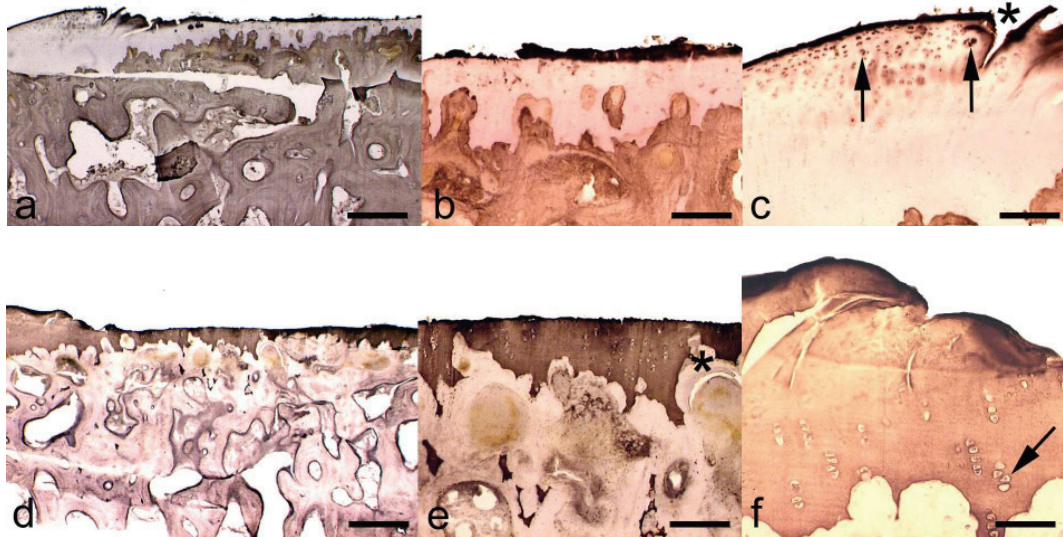


Abb.13: Chondrale Läsion. Immunhistochemische Färbung für Kollagen-I (a-c) und Kollagen-II (d-f), Kerngegenfärbung mit Mayers's Hämatoxylin.

- a) Übersichtsaufnahme einer medialen Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion (rechtsseitige 2/3 des Bildes). Der subchondrale Knochen ist braun (Kollagen-I positiv) markiert, die Reste des Gelenkknorpels sind nicht markiert (Kollagen-I negativ). Referenzstrecke 560 μm .
- b) Detailaufnahme aus a). Im zentralen Bereich der Knorpelläsion ist deutlich eine beginnende Invasion des subchondralen Knochens (bräunlich markiert) in die Reste des Gelenkknorpels zu erkennen. Referenzstrecke 180 μm .
- c) Detailaufnahme aus a). Chondrozyten im Randbereich der Knorpelläsion, sowie in unmittelbarer Nachbarschaft der Randfissuren (*) zeigen eine beginnende Kollagen-I-Expression (Pfeile). Referenzstrecke 180 μm .
- d) Übersichtsaufnahme einer medialen Femurkondyle mit oberflächlicher Knorpelläsion (rechtsseitige 2/3 des Bildes). Die Reste des Gelenkknorpels sind braun (Kollagen-II positiv) markiert, der subchondrale Knochen ist nicht markiert (Kollagen-II negativ). Referenzstrecke 560 μm .
- e) Detailaufnahme aus d). Zentralbereich der Knorpelläsion. Reste des mineralisierten Gelenkknorpels (bräunlich markiert) mit Invasion des unmarkierten subchondralen Knochens, welcher an einigen Stellen beinahe die Neogelenkfläche (*) bildet. Referenzstrecke 180 μm .
- f) Detailaufnahme aus d). Randbereich der chondralen Läsion mit deutlicher Verschmälerung des bräunlich markierten Knorpelniveaus, Fissurenbildung und initialisierter Clusterbildung (Pfeil). Referenzstrecke 180 μm .

3.3.2 Gruppe 2: Bioimplantat

Chondrale Defekte nach Versorgung mit einem Bioimplantat zeigten im Vergleich zu den Leerlöchern (2%) eine signifikant ($p < 0,05$) bessere Deckung mit 75,5% (63-87%) (Abb.14). Das Regenerat wies neben großen Kaliberschwankungen in der Dicke, eine unregelmäßige Oberfläche auf. Fissuren, die über 50% der Regeneratdicke durchbrachen, konnten in allen Defekten nachgewiesen werden.

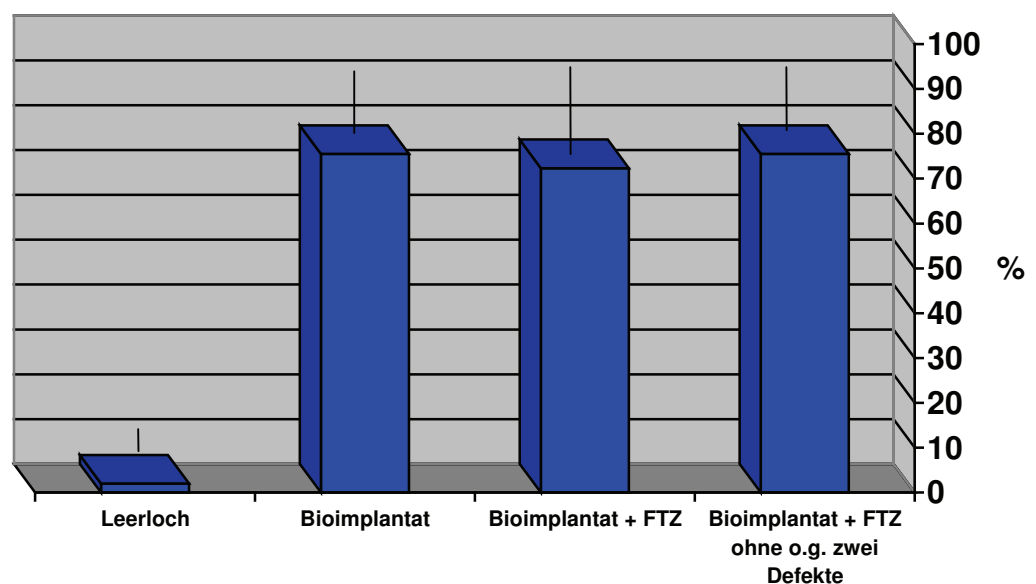


Abb.14: Prozentuale Deckung der chondralen Defekte mit Regeneratgewebe.

Die Bioimplantate erreichen mit einer durchschnittlichen Deckung von 75,5% (63-87%) eine signifikant bessere Deckung als die Leerlöcher (2%, 1-5%) ($p < 0,05$). Bei zusätzlicher Zellanreicherung in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch zeigen die Bioimplantate mit einer durchschnittlichen Deckung von 72,33% (47-89%) ebenfalls eine signifikant bessere Deckung im Vergleich zur Leerlochgruppe ($p < 0,05$). Der Ausschluss der o.g. zwei Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone hat keinen Einfluß auf die durchschnittliche Deckung (75,5%, 47-89%) ($p < 0,05$). Innerhalb der Bioimplantatgruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis.

Morphologisch erschien das Regenerat von knorpeliger Struktur mit hyalinen und faserknorpelartigen Anteilen (Abb.15). Die einzelnen Regeneratinseln waren dabei von stark unterschiedlicher Qualität geprägt. Im Gegensatz zum gesunden Knorpel war eine erhöhte Zellzahl im zentralen Bereich der Defekte erkennbar. In den

einzelnen Regeneratinseln waren die Chondrozyten nur spärlich säulenartig ausgerichtet und Blutgefäße reichten teilweise bis an die Oberfläche. Im Übergangsbereich zum gesunden Knorpel zeigte sich teilweise eine kontinuierliche Verbindung, auch für den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen-II (Abb.16). Eine leichte bis mittelschwere Hypozellularität mit Clusterbildung, im Sinne einer degenerativen Reaktion des gesunden Knorpels, konnte jedoch in den meisten Präparaten nachgewiesen werden. Das ursprüngliche Niveau der subchondralen Grenzlamelle war in einigen Bereichen nicht mehr erhalten, wodurch Regeneratgewebe stellenweise unterhalb der Knorpel-Knochengrenze lag. Die Anbindung des Regenerates an den subchondralen Knochen außerhalb dieser Einschmelzungen zeigte keinen Unterschied zum gesunden Knorpel.

Artifiziell entstandene zystische Defekte im subchondralen Knochen, welche durch das Herausbrechen der Darts beim Schneiden der histologischen Präparate entstanden, waren in allen Defekten nachweisbar.

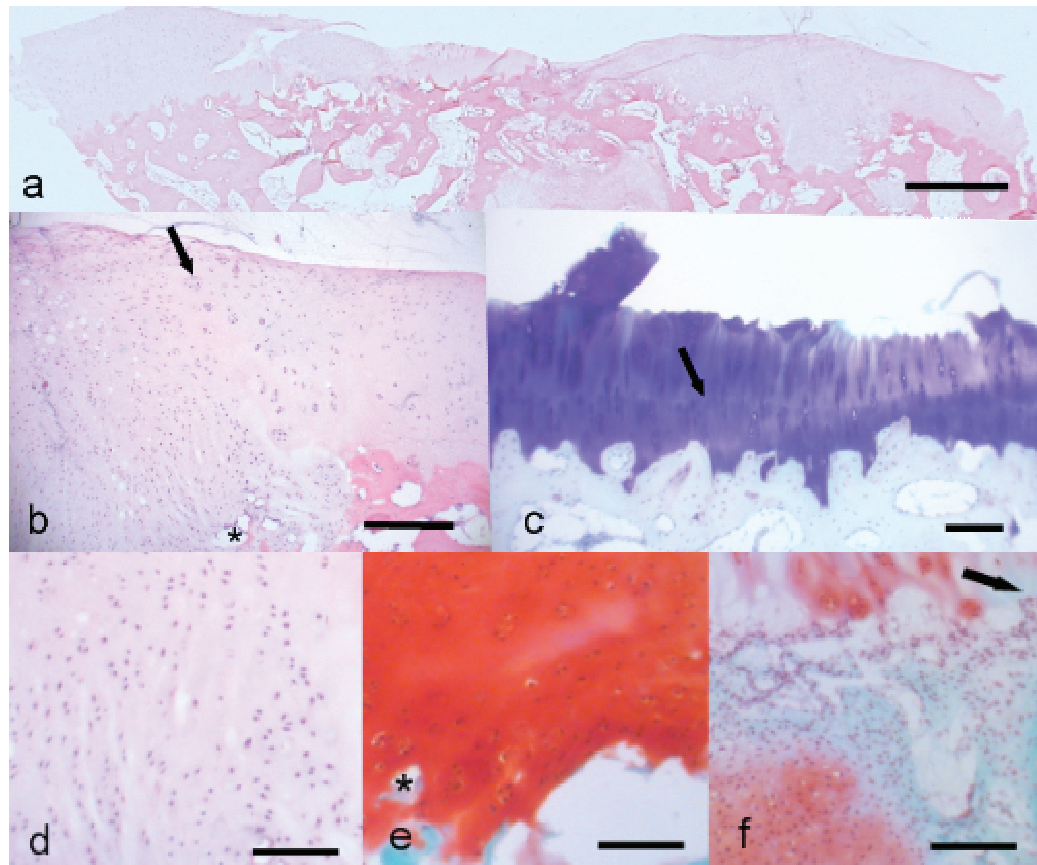


Abb.15: Histologie des Regenerates einer chondralen Läsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat.

- a) Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle mit mittig angeordneter oberflächlicher chondraler Läsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat. Die Gelenkfläche erscheint stark unregelmäßig, ist nicht vollständig mit Regeneratgewebe bedeckt und zeigt tiefe Fissuren. Die subchondrale Knochenlamelle ist teilweise durchbrochen, so dass Regeneratgewebe unterhalb der ehemaligen Knochenlamelle zu liegen kommt. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 1,3 mm.
- b) Randzone der chondralen Läsion mit hypozellulärem Areal und deutlicher Clusterbildung im Übergangsbereich (Pfeil). Der Übergang vom normalen Gelenkknorpel zum Regeneratgewebe ist kontinuierlich. Deutlich zu erkennen ist eine höhere Zellzahl im Regeneratgewebe (linker Bildrand), sowie einsprossene Blutgefäße (*) im Vergleich zum normalen Gelenkknorpel (rechter Bildrand). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 180 μ m.
- c) Hochauflösende Rekonstruktion der ehemaligen chondralen Läsion bei Färbung mit Toloidin-Blau. Deutlich zu erkennen ist die ehemalige Tidemark (Grenze zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Knorpel, Pfeil). In diesem Bereich der chondralen Läsion ist die Deckung spärlich ausgebildet. Das dünne Regeneratgewebe am rechten Bildrand enthält nur einen geringen Proteoglykananteil. (Verlust der Anfärbbarkeit mit Toloidin-Blau). Referenzstrecke 90 μ m.
- d) Detailaufnahme des Regeneratgewebes aus a). Das neu gebildete Knorpelgewebe ist deutlich hyperzellulär. Es zeigt sich eine longitudinale

Ausrichtung der Zellverbände mit einzelnen Clustern. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 90 µm.

- e) Zentraler Regeneratbereich mit Proteoglykan-reichem, rot gefärbten Knorpelgewebe und Bioimplantatrest (*). Unterhalb des Regenerates befindet sich ein Hohlraum, vermutlich ein artifiziell entstandener zystischer Defekt. Färbung mit Safranin-O/Lichtgrün/Eisenhämatoxylin nach Weigert. Referenzstrecke 90 µm.
- f) Subchondraler Bereich nach Einbruch der subchondralen Knochenlamelle (Pfeil). Deutlich erkennbar ist ein rot gefärbtes Regeneratnest umgeben von bläulich-grünen Proteoglykan-armen Knochenlamellen. Safranin-O/Lichtgrün/Eisenhämatoxylin nach Weigert. Referenzstrecke 90 µm.

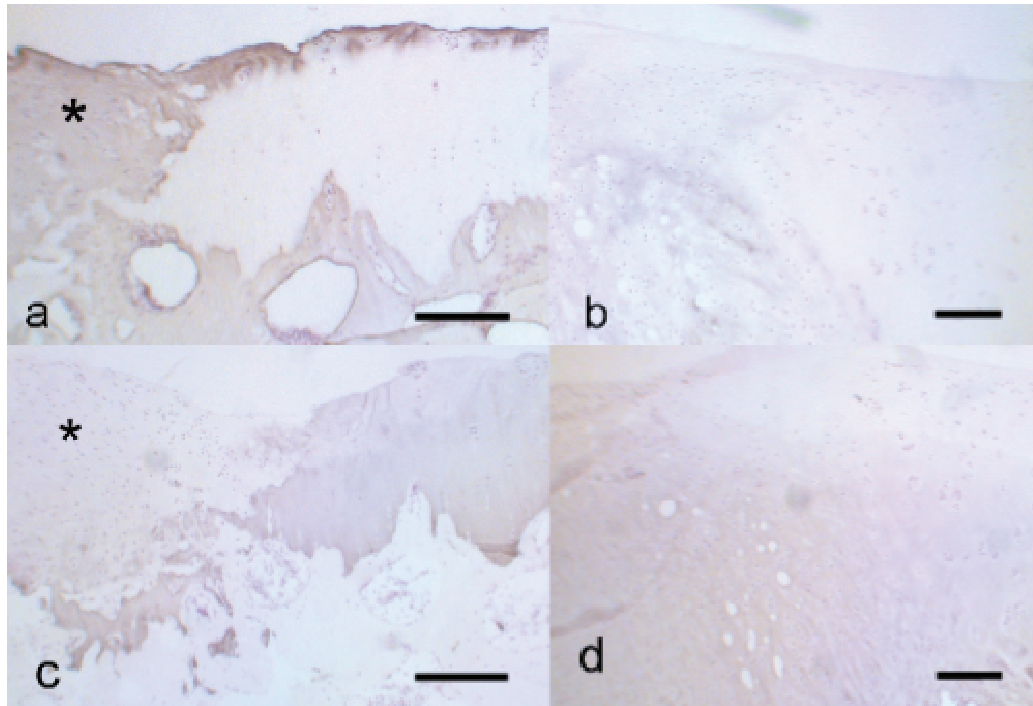


Abb.16: Chondrale Läsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat. Immunmarkierung für Kollagen-I (a-b) und Kollagen-II (c-d) mit Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

- a) Zentraler Regeneratbereich. Das Regeneratgewebe stellt sich weitgehend Kollagen-I negativ dar. Kleinere Areale des Regenerates aus Kollagen-I positiven Faserknorpelgewebe zeigten sich regelmäßig (*). Auffällig ist ein Kollagen-I positiver Saum an der Oberfläche des Regenerates. Der subchondrale Knochen ist positiv markiert. Referenzstrecke 180 μ m.
- b) Randbereich der chondralen Läsion. Sowohl das Regenerat (linker Bildrand) als auch der normale Gelenkknorpel (rechter Bildrand) zeigten keine immunhistochemische Anfärbbarkeit für Kollagen-I. Es findet sich eine geschlossene Deckung aus hyalinartigem Regeneratgewebe. Referenzstrecke 90 μ m.
- c) Zentraler Regeneratbereich mit unregelmäßiger Oberfläche. Neben Kollagen-II positiven hyalinartigen Regeneratanteilen zeigt sich ein weniger markiertes faserknorpeliges Areal (*). Der subchondrale Knochen ist Kollagen-II negativ. Referenzstrecke 180 μ m.
- d) Randbereich der chondralen Läsion. Kollagen-II positive Makierung des normalen Gelenkknorpels und des hyalinartigen Regeneratgewebes. Im apikalen hypozellulären Übergangsbereich zeigt sich ein Kollagen-II ärmeres Areal. Referenzstrecke 90 μ m.

3.3.3 Gruppe 3: Bioimplantat plus Fibrin und Zellanreicherung

Die zusätzliche Zellanreicherung der Bioimplantate in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch (FTZ) erreicht ebenfalls mit 72,33% (47-89%) eine signifikant ($p < 0,05$) bessere durchschnittliche prozentuale Deckung der chondralen Defekte im Vergleich zu den Leerlöchern (2%)(Abb.14). Neben tiefen Fissuren zeigte sich auch hier eine stark unregelmäßige Oberflächenstruktur, welche durch eine unterschiedliche Dicke von Regeneratgewebe geprägt wird. Sowohl hyalin- als auch faserknorpelartige Anteile konnten im Regeneratgewebe identifiziert werden (Abb.17). Die Zellzahl war im Vergleich zum gesunden Knorpel im gesamten Regenerat stark erhöht, wobei eine säulenartige Anordnung der Chondrozyten nur an wenigen Stellen zu erkennen war. Eine gute Anbindung an den gesunden Knorpel zeigte sich teilweise, doch wie bei der Bioimplantatgruppe waren degenerative Erscheinungen mit leichter bis mittelschwerer Hypozellularität und Clusterbildung im gesunden Knorpel nachweisbar. Das Niveau der subchondralen Grenzlamelle war an einigen Defekten stark eingesunken und mit Regeneratgewebe ausgefüllt.

Korrespondierend zu der Bioimplantatgruppe ließen sich die artifiziell entstandenen zystischen Defekte der Darts im subchondralen Knochen gut abgrenzen.

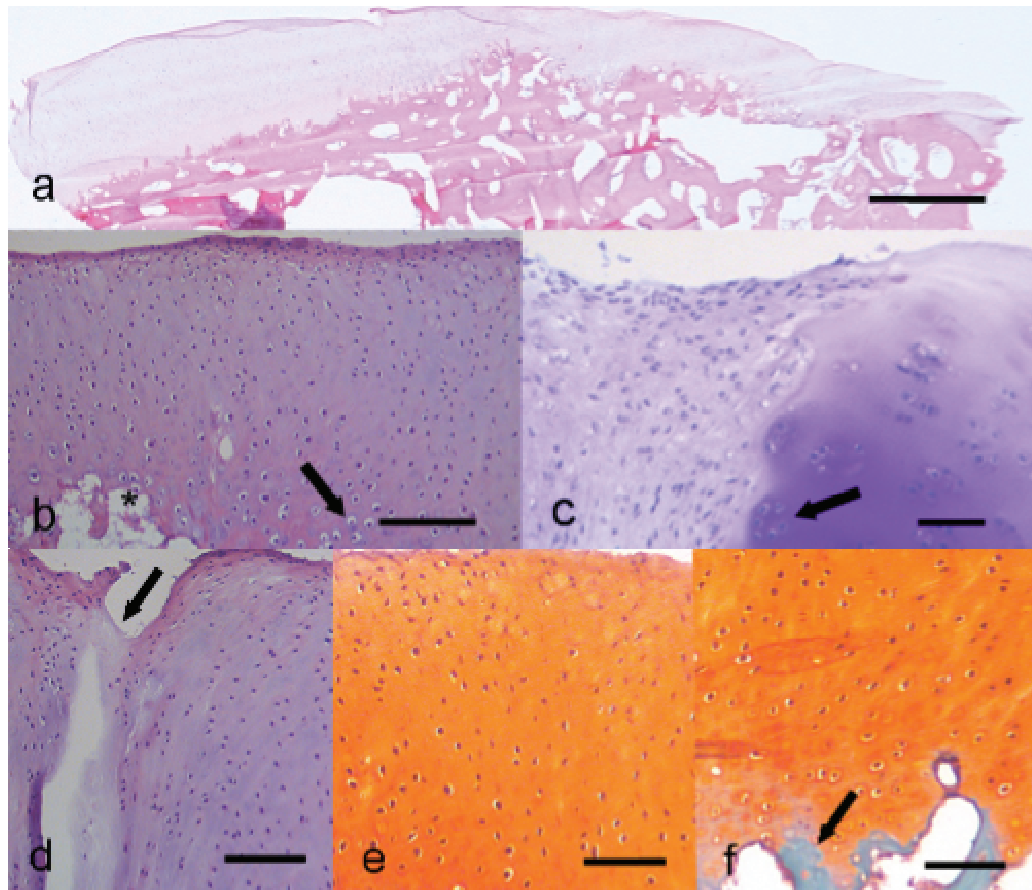


Abb.17: Histologie des Regenerates einer chondralen Läsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat plus Fibrin und Zellanreicherung.

- a) Übersichtsaufnahme einer Femurkondyle mit mittig angeordneter oberflächlicher chondraler Läsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat plus Zellanreicherung in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch. Die Gelenkfläche weist eine unregelmäßige Dicke auf. Einzelne Fissuren sind erkennbar. Die subchondrale Knochenlamelle ist teilweise durchbrochen, so dass Regeneratgewebe unterhalb der ehemaligen Knochenlamelle zu liegen kommt. Unterhalb des Regenerates befinden sich zwei artifiziell entstandene zystische Defekte, welche durch das Herausbrechen der Darts beim Schneiden der histologischen Präparate entstanden sind. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 1,3 mm.
- b) Zentraler Regeneratbereich mit neu gebildeten knorpelartigen Regeneratgewebe, welches deutlich hyperzellulär ist und einsprossene Blutgefäße beinhaltet (*). Eine longitudinale Ausrichtung der Zellverbände ist nur an wenigen Stellen zu erahnen. Es finden sich kaum Cluster. In der tiefen Zone ist die Knorpelhöhle der Chondrozyten (Raum, den Chondrozyten inmitten der Interzellulärsubstanz ausfüllen und durch Schrumpfungsprozesse sichtbar wird) gut erkennbar (Pfeil). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 180 µm.
- c) Randzone der chondralen Läsion mit hypozellulärem Areal und deutlicher Clusterbildung im Übergangsbereich (Pfeil). Der Übergang vom normalen Gelenkknorpel zum Regeneratgewebe ist kontinuierlich. Deutlich zu erkennen ist eine höhere Zellzahl im Regeneratgewebe, sowie ein

geringerer Proteoglykananteil (Verlust der Anfärbbarkeit mit Toloidin-Blau) (linker Bildrand), im Vergleich zum gesunden Knorpel (rechter Bildrand). Toloidin-Blau-Färbung. Referenzstrecke 90 µm.

- d) Detailaufnahme des Regeneratgewebes. Das neu gebildete Knorpelgewebe ist deutlich hyperzellulär. Eine longitudinale Ausrichtung der Zellverbände liegt nur vereinzelt vor. Es zeigt sich ein Defekt im Regenerat, bedingt durch einen über die Regenratfläche herausstehenden Dart (Pfeil). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Referenzstrecke 90 µm.
- e) Zentraler Regeneratbereich mit neu gebildeten knorpelartigen Regeneratgewebe. Es finden sich kaum Cluster. An einigen Stellen ist die die Knorpelhöhle der Chondrozyten (Raum, den Chondrozyten inmitten der Interzellulärsubstanz ausfüllen und durch Schrumpfungsprozesse sichtbar wird) gut erkennbar. Safranin-O/Lichtgrün/Eisenhämatoxylin nach Weigert. Referenzstrecke 90 µm.
- f) Tiefe Zone und subchondraler Bereich. Deutlich erkennbar ist der Unterschied zwischen dem rot gefärbten Proteoglykan-reichen Regeneratgewebe und dem bläulich-grün gefärbten Proteoglykan-armen subchondralen Knochen. Der Pfeil markiert die Grenzlamelle. Safranin-O/Lichtgrün/Eisenhämatoxylin nach Weigert. Referenzstrecke 90 µm.

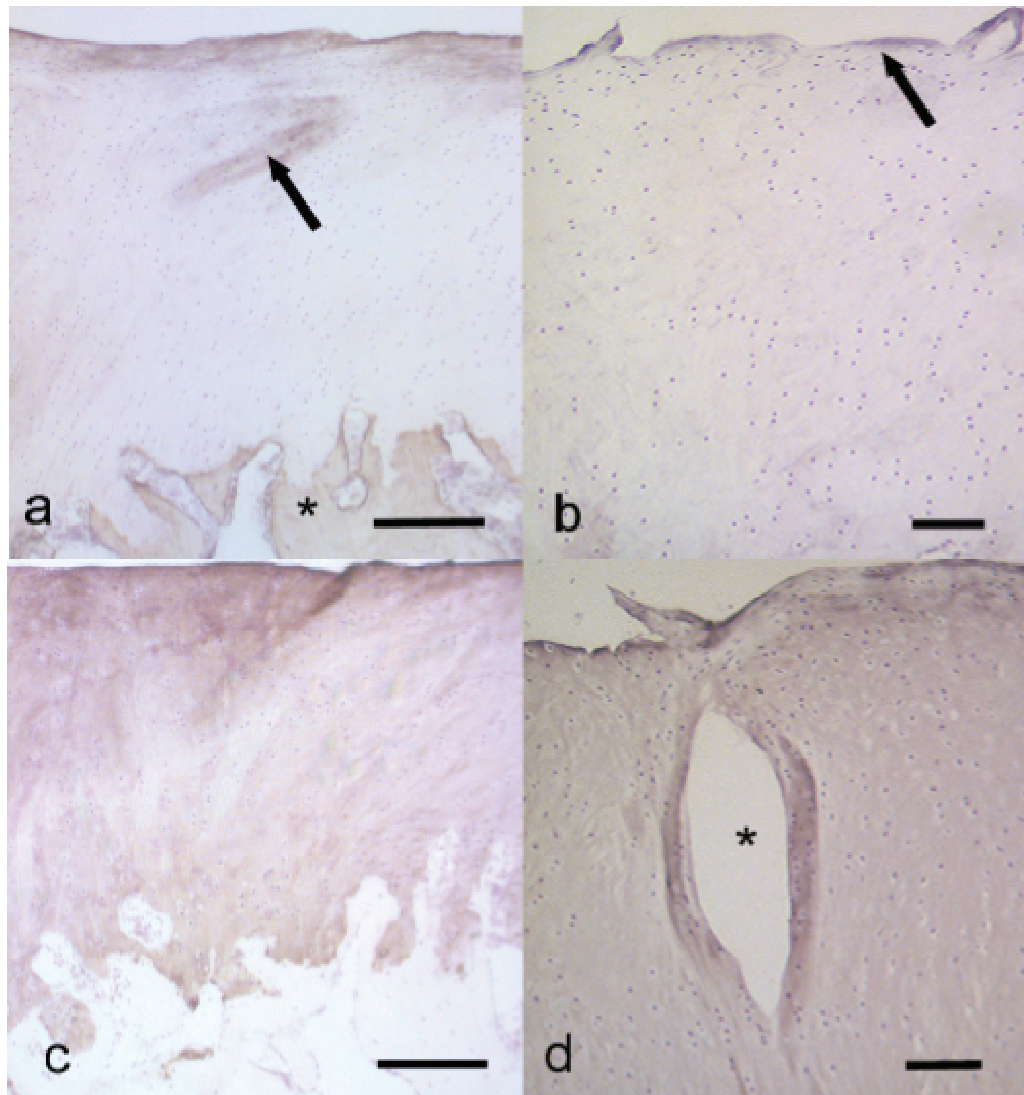


Abb.18: Chondrale Läsion nach Versorgung mit einem Bioimplantat plus Fibrin und Zellanreicherung. Immunmarkierung für Kollagen-I (a-b) und Kollagen-II (c-d). Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

- a) Zentraler Regeneratbereich. Das Regeneratgewebe stellt sich im Gegensatz zum subchondralen Knochen(*) Kollagen-I negativ dar. Kleinere Areale des Regenerates, insbesondere Gelenkflächennah, zeigen eine vermehrte immunhistochemische Anfärbbarkeit für Kollagen-I. Eine artifiziell durch Faltung und Überlagerungen des Schnittes entstandene vermehrte Anfärbbarkeit ist durch den Pfeil markiert. Referenzstrecke 180 μ m.
- b) Detailaufnahme des Regeneratgewebes. Auffällig ist ein Kollagen-I positiver Saum an der Oberfläche. Das übrige Regenerat ist Kollagen-I negativ. Es findet sich eine geschlossene Deckung aus hyalinartigem Regeneratgewebe. Referenzstrecke 90 μ m.
- c) Zentraler Regeneratbereich. Das Regeneratgewebe stellt sich Kollagen-II positiv dar. Die in (a) gelenkflächennahen Kollagen-I positiven Regeneratareale zeigen zusätzlich eine vermehrte immunhistochemische Anfärbbarkeit für Kollagen-II. Der subchondrale Knochen ist Kollagen-II negativ. Referenzstrecke 180 μ m.

- d) Detailaufnahme des Regeneratgewebes. Es liegt eine homogene immunhistochemische Anfärbbarkeit für Kollagen-II vor. Der Defekt (*) im Regenerat ist durch einen über die Regeneratfläche herausstehenden Dart bedingt. Artifizuell durch Faltung und Überlagerung ist die vermehrte Anfärbbarkeit des Defektrandes entstanden. Referenzstrecke 90 µm.

3.4 Ergebnisse und Auswertung mittels modifizierten O'Driscoll-Scores

Im Rahmen der histologischen Auswertung des O'Driscoll-Scores ergaben sich wesentliche Unterschiede durch die ventralen Defekte bei zwei Tieren der Gruppe 3. Diese Defekte lagen außerhalb der Hauptbelastungszone der medialen Femurkondyle. Daher erfolgt die histologische Auswertung mit und ohne diese zwei Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone. (vgl. Abs. 3.2.3).

Die Leerlochgruppe erreichte im original Score nach O'Driscoll einen mittleren Punktwert $5,6 \pm 3,7$ bei einer Spannweite von 2 bis 12 Punkten. Für die Bioimplantatgruppe errechnete sich ein besserer mittlerer Punktwert $7,5 \pm 1,29$ bei einer kleineren Spannweite von 6 bis 9 Punkten. Eine Zellanreicherung der Bioimplantate in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch zeigte unter Ausschluss der o.g. Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone ähnliche Ergebnisse mit einem Mittelwert von $7,25 \pm 3,2$ bei einer Spannweite von 5 bis 12 Punkten. Durch die geringe Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe und die sehr schlechte Regeneratqualität der zwei Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone in der Zellanreicherungsgruppe, ist der mittlere Punktwert $5,16 \pm 4,12$ mit einer großen Spannweite von 0 bis 12 unter Berücksichtigung dieser zwei Defekte noch kleiner als in der Leerlochgruppe.

In der Erweiterung erreichten die Leerlochregenerate durchschnittlich $2,7 \pm 1,9$ Punkte (Spannweite: 0-5), die Bioimplantate einen mittleren Wert von $4 \pm 0,81$ (Spannweite: 3-5) und die Zellanreicherung der Bioimplantate $4,16 \pm 2,31$ (Spannweite 1-7). Unter Ausschluß der außerhalb der Hauptbelastungszone liegenden Defekte ergibt sich ein Mittelwert in der dritten Gruppe von $5,5 \pm 1,29$ Punkten (Spannweite 4-7) und ist damit in der Erweiterung weniger different.

Der modifizierte Score nach O'Driscoll zeigte dementsprechend einen mittleren Punktwert von $8,3 \pm 4,7$ für die Leerlochgruppe, $11,5 \pm 1$ für die Bioimplantatgruppe und $9,34 \pm 6,25$ bzw. $12,75 \pm 4,27$ für die Bioimplantatgruppe mit Zellanreicherung in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch mit bzw. ohne die Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone (Tab.2).

Statistisch gesehen zeigte somit weder der originale noch der modifizierte Score nach O'Driscoll einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen

Resorbierbare Bioimplantate zur Regeneration von chondralen Defekten in einer tierexperimentellen Studie am Schaf

bezüglich der Qualität der Knorpelbildung im Areal der chondralen Läsionen (Abb.19). Die Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis war beim original Score nach O'Driscoll und bei der Modifikation in allen Fällen $p > 0,05$.

chondrale Defekte	Leerloch	Bio- implantat	Bio- implantat +FTZ	Bio- implantat +FTZ ohne Defekte außerhalb d. Haupt- belastungs- zone	max.
Zellmorphologie	1,3	2,5	1,67	2,5	4
Anfärbbarkeit der Matrix mit Safranin-O	1,2	1,5	0,83	1,25	3
Gleichmäßigkeit der Oberfläche	0,3	1	0,33	0,5	3
Strukturelle Integrität	0,2	0	0,17	0,25	2
Dicke	0	0	0	0	2
Verbindung mit angrenzendem Knorpel	0,3	1	0,67	0,75	2
Zellularität	0,3	0	0,17	0,25	3
Bildung von Chondrozytenclustern	0,2	0	0,17	0,25	2
Freiheit des angrenzenden Knorpels von deg.Erscheinungen	1,8	1,5	1,17	1,5	3
Anwesenheit von Kollagen-I	0,2	0,75	0,5	0,75	2
Anwesenheit von Kollagen-II	0,5	1	1	1,25	2
Anwesenheit von Aggrecan	0,5	1	1	1	2
Blutgefäße im Regenerat	0,8	0,25	0,83	1,25	2
Metachromasie bei Toloidin-Blau	0,7	1	0,83	1,25	2
Gesamt	8,3	11,5	9,34	12,75	34

Tab.2: Verteilung der durchschnittlichen Punktebewertung auf die einzelnen Kriterien des modifizierten Scores nach O'Driscoll. Im Vergleich dazu die maximal erreichbaren Punkte (gesunder hyaliner Knorpel) in der letzten Spalte.

Resorbierbare Bioimplantate zur Regeneration von chondralen Defekten in einer tierexperimentellen Studie am Schaf

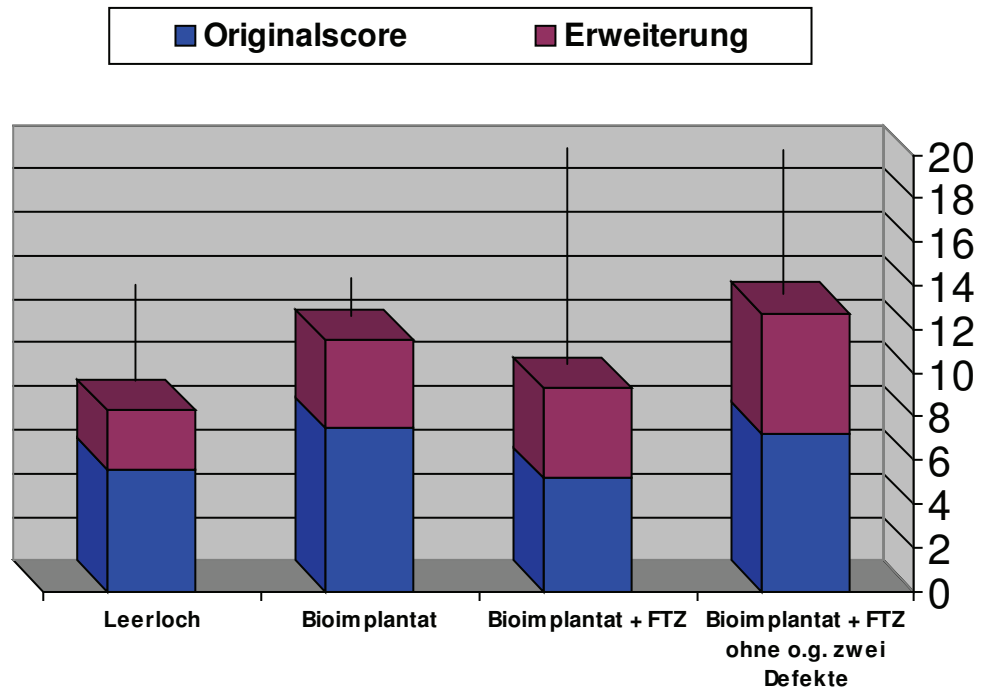


Abb.19: Graphische Darstellung der mittleren Punkteverteilung im modifizierten Score nach O'Driscoll. Statistisch zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$ Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis) im Vergleich aller Gruppen untereinander.

4. Diskussion

Die medizinische Bedeutung von isolierten chondralen Läsionen ist bis heute enorm groß. Grundlegend dafür ist die Tatsache, dass hyaliner Gelenkknorpel kein relevantes Selbstheilungsvermögen besitzt und derartige Läsionen zwangsläufig zur Arthrose des Gelenkes fortschreiten.^{21,51,52,80,82,99,117}

Die heutige Literatur stellt für die fehlende Spontanheilung von chondralen Defekten im wesentlichen zwei Hauptursachen in den Vordergrund.

Hyaliner Knorpel ist ein avaskuläres Gewebe.^{20,121} Die Wundheilungslehre beschreibt 3 Phasen der Gewebsheilung: 1. Nekrose, 2. Entzündung und 3. Proliferation und Reparatur. Die Entzündungsantwort ist ein vaskuläres Phänomen und tritt daher bei chondralen Läsionen nicht auf.^{72,74} Eine klinisch erscheinende aktivierte Arthrose mit Erguß, Schwellung und Überwärmung stellt lediglich die Entzündungsreaktion der stark vaskularisierten Synovialis auf degenerative Knorpelteilchen dar und sollte nicht mit einer Entzündungsreaktion der chondralen Läsion fehlinterpretiert werden.^{7,123}

Der zweite Aspekt ist die geringe Anzahl der Vorläuferzellen.¹²¹ Chondrozyten im Randbereich von experimentell gesetzten chondralen Läsionen zeigen zwar eine geringe Proliferationstendenz, sowie eine gesteigerte Kollagen- und Glykosaminoglykansynthese, eine endgültige Reparatur kommt jedoch nicht zustande.^{39,42,72,74}

Bekannt ist jedoch, dass mesenchymale Stammzellen und Zellen der inneren Schicht von Periostlappen („Cambium Layer“) die Fähigkeit besitzen, sich abhängig von lokalen Einflüssen in unterschiedliche Zelllinien u.a. in Chondrozyten zu differenzieren.^{13,46,54,55,92,93,131}

Diese Erkenntnisse führten zu zahlreichen klinischen und experimentellen Therapieansätzen. Bei der Pridie-Bohrung oder der Mikrofrakturierung wird mit Eröffnung des subchondralen Raumes ein Anschluß an das Knochenmark mit der Folge des Einblutens in den Defekt erreicht. Die reparative Antwort wird eingeleitet, welche die Bildung eines Fibringerinnsels, Zellmigration aus dem Knochenmark und die damit assoziierte Vaskularisierung beinhaltet.²² Brittberg und Petersons Therapieansatz versucht die geringe Anzahl von Vorläuferzellen auszugleichen, indem es bioptierte Chondrozyten in vitro amplifiziert, replantiert

und annimmt, dass sich die Chondrozyten in vivo zu hyalinem Knorpel mit seiner Architektur und Faserstruktur organisieren.^{17,101} Das entstehende Regenerationsgewebe bei diesen Methoden ist jedoch allenfalls ein Mix mit fibrösen, fibrocartilaginären und hyalinartigen Anteilen und weist nicht die mechanische Stabilität des hyalinen Knorpels auf. Es degeneriert innerhalb kürzester Zeit bis zur Arthrose.^{28,40,55,117}

Auf der Grundlage dieser Therapieansätze wurden ständig neue Modifikationen als sogenanntes „Tissue engineering“ zur Verbesserung der Regeneratqualität entwickelt. Wachstumsfaktoren^{33,86,132,133,143}, Trägermaterialien^{1,36,49,77,116,122,134,138} und die Beeinflussung der Differenzierung durch gezielte mechanische Belastung^{45,49,70,95,128} führten zu besseren Ergebnissen, jedoch nicht zu hyalinem, belastungsstabilem Gelenkknorpel.

4.1 Bioimplantate

Zahlreiche Autoren haben die verschiedensten Gründe für die mangelhaften Eigenreparaturmechanismen und damit verbundenen inkompletten „restitutio ad integrum“ von chondralen Läsionen in der Literatur beschrieben.^{39,51,74,80,99}

Grundlegende Erkenntnisse aus der Literatur waren dabei ausschlaggebend für die Entwicklung und Verwendung eines Bioimplantates insbesondere in Kombination mit einer in vivo Zell-Anreicherung in dieser Arbeit.

1. Gesunder hyaliner Knorpel besitzt ein dreidimensionales Kollagenfibrillennetzwerk, welches dem physiologischen Quellsdruck entgegen wirkt und somit das Gewebe unter Spannung setzt, was zu seiner Verformungsfestigkeit führt und Grundlage für eine normale Gelenkfunktion ist.¹⁰⁴ In Anbetracht der Nachahmung dieses physiologischen Grundgerüsts haben sich in sog. in vitro Bioreaktoren dreidimensionale Konstrukte durchgesetzt.^{36,49} Zudem bietet die Offenporigkeit dreidimensionaler Konstrukte eine gute Zellintegration, Nährstoffdiffusion und Erhalt der phänotypischen Stabilität.^{14,100} Diese Zell-Matrix-Interaktionen beeinflussen über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, vermittelt über zelluläre Adhäsionsmoleküle, direkt Morphologie und Funktion der Zellen, wie beispielsweise Proliferation, phänotypische Differenzierung und Matrixsynthese.¹²⁰

2. Chondrozyten weisen eine zu geringe mitotische Aktivität auf, um durch Proliferation in der Defektperipherie eine signifikante Heilung zu ermöglichen.^{67,118} Zusätzlich konnte in mehreren in vitro Studien gezeigt werden, dass Chondrozyten ihre phänotypischen Eigenschaften und damit die Fähigkeit Kollagen-II und gewebespezifische Proteoglykane zu produzieren verlieren.^{10,44,111,136} Das Einsprossen von mesenchymalen Stammzellen in den Defekt, welche das Potential zur chondrogenen Differenzierung besitzen ist entscheidend für einen relevanten Regenerationsversuch.^{11,19,23,24,39,45} Dieses kann entweder durch Eröffnung des subchondralen Knochens mittels Knochenmark-Stimulations-Techniken oder durch eine intraoperative Zellanreicherung ermöglicht werden. Leicht in der Handhabung ist dabei Fibrin, da es sich in der

löslichen Phase als Fibrin-Zell-Mix präzise in eine dreidimensionale Form bringen lässt, in atoxische physiologische Abbauprodukte degradiert und somit keine Toxizität besitzt.¹³⁵ Neuere Studien zeigten jedoch negative Effekte auf Proliferation und Matrixsynthese bei höheren Fibrin- und Thrombin-Konzentration.^{9,26} Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch die insuffiziente biomechanische Stabilität.^{50,135}

3. Auf der Grundlage der „kausalen Histogenese“ von Pauwels und Kummer^{68,96,97} zeigten Tägil und Aspenberg welchen Einfluß zyklische Kompressionen mit definiertem Druck und Frequenz auf mesenchymalen Stammzellen ausüben.¹²⁸ Der subchondrale Knochen ist der wichtigste Stoßabsorber des Gelenkes und ist damit als Widerlager entscheidend für das Einwirken mechanischer Kräfte auf den Knorpel bzw. das Bioimplantat.¹⁰⁸ Eine insuffiziente morphologische Qualität des Knorpelregenerates sowie dessen vorzeitige Degeneration beruhen möglicherweise auf einer unzureichenden Unterstützung durch den subchondralen Knochen.⁸¹ Ein suffizientes Widerlager in Form eines intakten subchondralen Knochens ist somit Voraussetzung für eine Knorpelinduktion im Bioimplantat.

4. Das Bioimplantat muss biodegradierbar sein, dass eine „Restitutio ad integrum“ der chondralen Läsion aufgrund biomechanischer und humoraler Einflüsse erreicht werden kann. Nichtresorbierbare Implantatreste könnten das Modelling des Knorpels bezüglich seiner Architektur mit der spezifischen Zellanordnung in einem dreidimensionalen Kollagen Netzwerk und der typischen Zonenentwicklung stören. Eine fehlende Integration des Regenerates sowie verbleibendes Implantatmaterial wären der erste Schritt zur Präarthrose.

Die zwangsläufig entstehenden Abbauprodukte eines biodegradierbaren Implantats dürfen keine entzündlichen oder immunologischen Reaktionen auslösen.

Die beste Biodegradierbarkeit und Biokompatibilität erhält man mit Biomaterialien aus resorbierbaren Estern.² Der bekannteste und in den hier vorliegenden Versuchen als Verankerungsarts verwendete Werkstoff ist das Poly-DL-Lactid, ein langkettiges Polymer aus dem zyklischen Ester der

Milchsäure mit einer Abbaupzeit von 40-50 Wochen. Polylactidsäure (PLA) wird seit längerem in der Chirurgie u.a. als Fadenmaterial, resorbierbare Platten und Schrauben oder als Duraersatz für die gerichtete Geweberegeneration verwendet. Das Material wird rein hydrolytisch und nicht enzymatisch in einzelne Lactatmoleküle abgebaut. Lactat ist natürlicher Metabolit des Kohlenstoffmetabolismus.^{66,103} Im Organismus können diese α -Hydroxysäuren in den normalen Stoffwechsel eingeschleust werden, jedoch kann es bei einem verlangsamten Abtransport auch zur Anhäufung der sauren Abfallprodukte im Bioimplantat mit Verschiebung des pH-Wertes kommen. Dieses könnte die Differenzen zwischen in vivo- und in vitro Studien mit einem schnellen Abtransport der sauren Abbauprodukte in Perfusionskammern erklären. Des weiteren muss die Möglichkeit einer entzündlichen zellulären Reaktion des umliegenden Gewebes unter der Beteiligung von Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen als kritisch betrachtet werden.^{1,122} Britt und Park beobachteten eine Fremdkörperriesenzellreaktion bei autologen Chondrozyten in einem PGA/PLA Vlies und eine Resorption des implantierten Knorpelmaterials nach 4 Wochen. Sie vermuten das die entzündliche Reaktion entscheidend die Chondrogenese gestört hat.¹⁵

Die Resorptionszeit hängt von verschiedenen Faktoren wie z.B. Kristallinität oder den Molekulargewichten der Polymere ab. Das in dieser Arbeit verwendete Vlies aus Polyglykolid (PGA) (ITV Denkendorf, Deutschland) besitzt als Grundbaustein α -Hydroxysäuren und gehört zu den sehr schnell resorbierbaren Polymeren bei Polylactid ähnlichem Degradationsmechanismus. Bedingt durch eine stärkere Hydrophilie und Kristallinität besitzt es gegenüber PLA eine kürzere Haltbarkeit von 8-16 Wochen. Sittering beobachtete, dass die Vliesstruktur im Medium ohne Zellen etwa doppelt so lange erhalten bleibt wie in einer Kultur.¹¹⁹ Folglich begünstigen Zellen die Degradation. Makrophagen besitzen z.B. die Fähigkeit ein Kulturmedium so zu konditionieren, dass der Zerfall der Polymere beschleunigt wird. Freie Hydroxyradikale scheinen dabei Hauptursache für die gewebe- bzw. zellvermittelte Degradation zu sein.

Die Eignung des Polymers zum Tissue engineering wurde bereits in mehreren Arbeiten dargestellt.^{35,119,129} Aus Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe ist der Faserabstand des PGA-Vlieses von ca. 40-150 μm als günstig anzusehen, der

einerseits eine Adhärenz von Zellen an die Fasern zulässt, andererseits die Matrixproduktion nicht behindert. Dennoch bleibt die quantitativ geringe Haftung der Zellen an die Vliesstruktur ein Nachteil. Sowohl durch mechanische Kräfte als auch durch die Schwerkraft kommt es zu einer Bewegung und dadurch zu einem Verlust der Zellen, welche nicht an Vliesfasern haften. Rudert versuchte dieses mittels kleinerer Kulturgefäße *in vitro* zu lösen.¹¹³ *In vivo* gestaltet sich die Situation jedoch anders. Dem Verlust könnte zumindest geringgradig entgegengewirkt werden indem die Vliesfasern „adhäsiver“ gemacht werden, z.B. mit Adäsionsfaktoren oder die Zellen durch eine visköse Suspension wie z.B. Agarose oder das in diesen Versuchen verwendete Fibrin-Thrombin-Gemisch in der Vliesstruktur gehalten würden. *In vivo* Studien zeigten jedoch die insuffiziente biomechanische Stabilität solcher Suspensionen.^{50,135} Eine Interaktion zwischen Biomaterial und Gewebe bzw. Zellen ist für die phänotypische Entwicklung der Zellen und der synthetisierten Matrix nicht zwingend notwendig. Eine Interaktion wäre sogar unerwünscht, wenn das Biomaterial einen negativen Einfluss auf die Zellen hat. Ein flächiges Ausbreitungsverhalten der Zellen, wie es aufgrund fehlender Zell-Faser-Adhärenz und Schwerkraft *in vitro* entsteht, entspricht weitestgehend einer Monolayerkultur. Mehrere Studien konnten zeigen, das ausdifferenzierte Chondrozyten in solchen Kulturen ihre phänotypischen Eigenschaften, charakterisiert durch ihre runde Zellmorphologie, ihre Fähigkeit Typ-II-Kollagen und gewebespezifische Proteoglykane zu produzieren, verlieren.^{10,44,111,136} Die Zellen müssen demnach nur an die Fasern binden, damit sie ihre Position behalten und dabei spielt es keine Rolle, ob die Bindung an die Bioimplantatfaser direkt oder indirekt über eine Matrix erreicht wird. Diese Erkenntnisse sind möglicherweise neben einer zu geringen Ausgangszelldichte eine weitere Ursache für die inhomoge Verteilung des Regeneratgewebes im Bioimplantat.

Die intraoperative manuelle Anpassung der Bioimplantatoberfläche erwies sich als problematisch. Aufgrund fehlender Stabilität ließen sich einige PLA-Darts nicht in den dafür vorgesehenen Löchern verankern bzw. versenken. In einigen Fällen mussten sogar einzelne Darts entfernt werden oder kamen quer unter dem Bioimplantat zu liegen. Fehlende Oberflächenkongruenz, einzelne Bereiche mit erhöhten Druckspitzen und Bioimplantatinstabilität im Defekt waren die Folge. Solche Druckspitzen können die Induktion von Knorpel verhindert bzw. eine

vorzeitige Degeneration bewirkt haben.³⁸ Überstehende Darts führten sogar zur makroskopischen Schädigung der Menisci und des Knorpels auf dem korrespondierenden Tibiaplateau (Abb.11).

4.2 Chondrale Defekte im Schafsmodell

Zur Überprüfung der Hypothese der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Knorpelgewebe durch mechanische Belastung in resorbierbaren Bioimplanten wurde ein Schafsmodell gewählt. Nach Durchsicht der Literatur scheint das Kaninchen das am häufigsten gewählte Versuchstier für Untersuchungen der Knorpelregeneration zu sein.^{17,31,34,40,45,46,72,80,81,92,107,137} Auf diese Weise würde aufgrund der breiten Vorkenntnisse aus der Literatur eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse entstehen, jedoch bietet das Kaninchen einige Nachteile. Dem Kaninchen wird ein höheres Regenerationspotential bei Knorpeldefekten zugesprochen.^{88,118} Des weiteren liefert das Kaninchenmodell eine entscheidende operationstechnische Einschränkung. Die Knorpeldicke des Kaninchens beträgt ca. 0,2 mm. Insofern würde sich die ohnehin sehr schwierige manuelle Anpassung der Knorpelersatzschicht des Bioimplantates an die normale Knorpelschicht zusätzlich problematisch gestalten. Kleinste Inkongruenzen der artifiziellen Gelenkschicht, sowie Abweichungen vom angestrebten Gelenkniveau könnten Druckspitzen erzeugen, welche eine Differenzierung mesenchymaler Stammzellen und damit die Induktion von Knorpel verhindern.³⁸ Möglicherweise scheint dieses ein Grund für die teilweise große Diskrepanz der Ergebnisse der zahlreichen Knorpeldefektstudien am Kaninchenmodell zu sein.

Zum Funktionsnachweis musste ein Tiermodell gewählt werden, welches eine gute Anpassung der Bioimplantate erlaubt und gleichzeitig vom Regenerationsverhalten und Knorpeldicke dem Menschen ähnlicher ist als das Kaninchen. Neben Schafen stehen gemäß Literatur zusätzlich Hund, Pferd und Ziege als geeignetes Versuchstier zur Verfügung.^{29,53,60,73,90,91,118,135} Unter Beachtung der „kausalen Histiogenese“ von Pauwels und Kummer^{68,96,97} erlaubt die meist stehende Lebensweise des Schafes im Gegensatz zum Hund eine bessere mechanische Belastung des Bioimplantates zur Induktion von Knorpel. Zusätzlich ermöglicht die Größe des Schafkniegelenks ein präziseres Einbringen von

oberflächenpaßgenauen Bioimplantaten in die Defekte. Eigene Messungen zeigten, dass die Schafe im Bereich der Hauptbelastungszone der medialen Femurkondyle eine durchschnittliche Knorpeldicke von 1 mm aufweisen.

Für die Versuche wurden ausgewachsene ca. 1 Jahr alte und ca. 60 kg schwere weibliche Merinoschafe ausgewählt. Die Beschränkung auf lediglich weibliche Schafe lag in Gründen der Kohabitations- und sozialer Konfliktvermeidung in der postoperativen gemeinschaftlichen Stallhaltung. Das Regenerationspotential bei im Wachstum befindlichen Tieren wird im allgemeinen höher angesehen als bei erwachsenen Tieren. Schafe gelten ab Beendigung des ersten Lebensjahres als ausgewachsen und es findet kein Längenwachstum mehr statt. Nach Wachstumsabschluss hat das Alter keinen Einfluss auf das Regenerationsverhalten.^{39,78}

Das artifizielle Herbeiführen von zwei Defekten mit 8mm Durchmesser auf der medialen Femurkondyle führte zur weitgehenden Zerstörung des Knorpels im lasttragenden Bereich des medialen Kniegelenkkompartimentes. Die Defektgröße wurde entsprechend groß gewählt um eine Vergleichbarkeit mit klinisch relevanten Knorpeldefekten, wie sie z.B. nach Trauma oder Nekrose entstehen, zu erhalten.^{82,117} Des weiteren gibt es Hinweise das kleine Knorpeldefekte ein hohes Potential zur Selbstheilung besitzen. Convery konnte in einer Untersuchung am Pferd zeigen, dass Defekte mit einem Durchmesser von 3 mm eine bessere Defektfüllung aufweisen als 9 mm Defekte.²⁹

Das Einsprossen von mesenchymalen Stammzellen in den Defekt, welche das Potential zur chondrogenen Differenzierung besitzen, ist entscheidend für einen relevanten Regenerationsversuch.^{11,19,23,24,39,45} Histologisch zeigte sich bei unseren Versuchen, dass der nichtmineralisierte Knorpel vollständig und großflächig entfernt wurde und lediglich eine dünne Schicht mineralisierter Knorpel stehen blieb. Bei der Schaffung der Verankerungslöcher in den Bioimplantatgruppen wurde der subchondrale Raum eröffnet, so dass bereits intraoperativ von einem Bluteinstrom und folglich mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark ausgegangen werden muss. Durch das Einbringen der Darts wurden die Verankerungslöcher nahezu komplett versiegelt, nicht jedoch die Öffnung des zentralen Führungsdorns, so dass hier ein weiteres Einsprossen von mesenchymalen Stammzellen möglich war. Die histologische Auswertung der Leerlochpräparate zeigte, dass in allen Defekten an mehreren Stellen Risse zum

Subchondralraum vorhanden waren, inwieweit über diese Mikropalten Einwandern von mesenchymalen Zellen in das Implantat möglich war, bleibt fraglich. Das Einschlagen der Dartlöcher führte in einigen Fällen zum Einbruch der subchondralen Platte. Das Widerlager, welches entscheidend für das Einwirken mechanischer Kräfte auf das Bioimplantat und damit für die Knorpelinduktion ist, wurde in diesen Fällen zerstört. Die insuffiziente morphologische Qualität des Knorpelregenerates bzw. dessen vorzeitige Degeneration beruhen möglicherweise auf einer unzureichenden Unterstützung durch den subchondralen Knochen.⁸¹

In der Versuchsgruppe 3 (Bioimplantat plus Fibrin und Zellanreicherung) lagen bei zwei Schafen die jeweils ventralen Defekte aufgrund schlechter Orientierung bei minimal-invasivem Zugang außerhalb der Hauptbelastungszone (ventrale Femurkondyle). Die histologische Begutachtung zeigte eine qualitativ schlechte Regeneratbildung ähnlich zur Leerlochgruppe, welches möglicherweise in der zu geringen oder fehlenden mechanischen Induktion liegt.^{68,102,103} Bei der in dieser Arbeit geringen Defektanzahl pro Gruppe (n=6) hat dieses einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse. Die Auswertung ist daher getrennt erfolgt.

4.3 Beurteilungsschema der Ergebnisse

Nach Durchsicht der Literatur erfolgte die Beurteilung eines Knorpelregenerates zunächst anhand von histologischen Übersichtsfärbungen deskriptiv.^{29,39,45,46,92} Zur besseren Spezifizierung des Regeneratgewebetyps fertigten einige Autoren zusätzlich immunhistochemische Färbungen an.^{54,83,128} Verschiedene semiquantitative Scores^{91,100} wurden eingeführt, u.a. nach Pineda^{89,102,137} oder O'Driscoll^{17,93}, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen tierexperimentellen Studien zur Knorpelregeneration zu erreichen. Neuere Modifikationen dieser Scores sollen bestimmte Aspekte der Regeneratqualität mit einbeziehen.¹²¹ Problematisch scheint die Tatsache, dass sich bei allen Methoden zur Knorpeldefektheilung in der Regel kein einheitliches Regenerat bildet und folglich die Ergebnisse von der subjektiven Einschätzung des Untersuchers sowie des herangezogenen Regeneratanteils stark beeinflusst werden. Aus diesem Grunde ist auch die Angabe der prozentualen Deckung des Defektes mit Regeneratgewebe für die Qualität einer Arbeit von großer Bedeutung.¹²¹

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte in dieser Arbeit durch einen modifizierten Score nach O'Driscoll. Der originale Score wurde dabei mit immunhistochemischen Nachweismethoden (Kollagen-I, Kollagen-II und Aggrecan), sowie mit der Metachromasie bei Toloidin-Blau ergänzt. Auf diese Weise konnte eine bessere Spezifizierung des Gewebetypus erreicht werden.⁸³ Das Vorhandensein von Blutgefäßen im Regenerat als Zeichen eines bindegewebigen Umbaus vervollständigte die Modifikation. Zusätzlich wurde die prozentuale Deckung mit Regeneratgewebe bei allen Defekten bestimmt und gesondert ausgewertet.

Um eine höhere Objektivität und Reproduzierbarkeit der Beurteilung zu erreichen, wurde die Bewertung nach einem standardisierten Schema durch zwei unabhängige verblindete Untersucher durchgeführt. In den meisten Defekten zeigten sich Bereiche von fehlendem Regenerat über eine bindegewebige Narbe bis hin zu faserknorpelähnlichen und hyalinartigen Strukturen. Aus diesem Grund wurde immer schematisiert über einen zentralen Schnitt die Mitte des ehemaligen Defektes aufgesucht und die schlechteste Regeneratqualität beurteilt. Dabei wurde ein inhomogenes Regenerat immer als ungünstig gewertet und dementsprechend

der niedrigste Punktwert im Score nach O'Driscoll zugewiesen. Es galt im Falle von Knorpelgewebe im Defektgrund bei oberflächlicher faserreicher Defektfüllung den oberflächlichen, gelenknahen Regeneratanteil zu beurteilen. Im Gegensatz zum original Score nach O'Driscoll sind andere Autoren der Meinung, dass eine Hyperzellularität des Regeneratgewebes ein negatives Kriterium darstellt.⁹¹ Einem hyperzellulären Gewebe wurde jeweils der ungünstigste Punktwert zugewiesen. Eine knorpelartige Anbindung an den normalen Knorpel wurde als günstig gewertet, nicht jedoch eine faserreiche bindegewebige Anbindung. Dabei wurden Clusterbildungen im unmittelbarem Randbereich und im weit entfernten gesunden Knorpel als Zeichen der Degeneration gesondert betrachtet.

Bei diesem Beurteilungsschema wird somit die Regeneratbildung sehr kritisch und schematisiert bewertet. Dies hat zur Folge das in einigen Fällen nicht das für die Regeneration repräsentative Gewebe beurteilt wurde. Deshalb wurde zusätzlich mittels immunhistochemischen Nachweismethoden und der Metachromasie bei Toloidin-Blau das restliche Gewebe erfasst. Es zeigte sich ein Regeneratgewebe von unterschiedlichster Qualität und Struktur. Dies macht verständlich, dass eine objektive und reproduzierbare Beurteilung, welche einen sicheren Vergleich zwischen einzelnen Arbeitsgruppen zulässt, nur bei einer homogenen Regeneratbildung möglich ist. Des weiteren bewertet der O'Driscoll Score strukturelle Charakteristika des Regenerates, wie Gleichmäßigkeit der Oberfläche, Dicke und Verbindung zum angrenzenden Knorpel, strukturelle Integrität und Freiheit des angrenzenden Knorpels von Degeneration, überproportional hoch (50% der maximalen Punktzahl). Eine reproduzierbare Bewertung dieser Kriterien scheint bei inhomogen Regeneraten problematisch und führt nach unserem standardisierten Bewertungsschema zu schlechteren Ergebnissen.

Die Erweiterung des O'Driscoll Scores soll insbesondere eine Unterscheidung zwischen faserknorpel- und hyalinartigen Gewebe ermöglichen. Einen Hinweis auf die mögliche biomechanische Stabilität des Regenerats, welche im wesentlichen durch die Proteoglykane bestimmt wird, erfolgte mit dem immunhistochemischen Nachweis von Aggrecan.

4.4 Ergebnisse

Nach Konstruktion geeigneter Implantate sollte anhand einer tierexperimentellen Studie gezeigt werden, dass mittels dieser resorbierbaren Bioimplantate durch mechanische Induktion eine Regeneration von chondralen Defekten durch hyalinen Knorpel möglich ist. Des weiteren sollte nachgewiesen werden, dass die Regeneration durch mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark erfolgt und somit eine intraoperative Anreicherung dieser Zellen im Implantat gerechtfertigt ist.

Das äußerst geringe bzw. fehlende Regenerationspotential chondraler Defekte bestätigte sich in den Versuchen dieser Studie. Vergleicht man die chondralen Leerlöcher unserer Versuchsreihe mit osteochondralen Leerlöchern anderer Arbeitsgruppen zeigt sich eine deutlich bessere Heilungstendenz osteochondraler Defekte. Wei und Mitarbeiter untersuchten osteochondrale Defekte am ausgewachsenen Kaninchen nach 24 Wochen.¹⁴⁰ Nach Auswertung des Score nach O'Driscoll erreichten die Regenerate 10 Punkte bei einer prozentualen Deckung von 75,5%. Die rein chondralen Leerlöcher unserer Versuchsreihe lagen mit einem Punktwert von 5,6 bei einer Deckung von 2% deutlich niedriger. Dies kann möglicherweise an dem längeren Nachbeobachtungszeitraum und dem höheren Regenerationspotential von Kaninchen gegenüber Schafen gelegen haben.^{88,118} Dennoch scheint dieser Vergleich die Erkenntnisse der Literatur zu bestätigen, dass eine Eröffnung des subchondralen Raums mit dem damit verbundenen Einströmen von mesenchymalen Stammzellen als Grundlage der Regeneratbildung von großer Bedeutung ist.^{11,19,23,24,39,45} Betrachtet man die histologischen Schnitte der chondralen Leerlöcher, zeigt sich, dass beim Fräsvorgang der mineralisierte Knorpel nicht immer vollständig entfernt wurde. Zwar zeigen sich in mehreren Präparaten kleinste Spaltbildungen im subchondralen Raum, aber diese sind möglicherweise artifiziell beim Herstellen der Schnitte entstanden. Des weiteren bleibt es fraglich, ob diese Spalten, wenn sie denn in vivo schon vorhanden waren, vom Durchmesser ein Einströmen von mesenchymalen Zellen erlaubt hätten.

Bei den Bioimplantatgruppen zeigte sich eine signifikant bessere Deckung mit Regeneratgewebe (Bioimplantat 75,5% bzw. Bioimplantat plus Zellanreicherung

72,33% versus Leerloch 2%), auch wenn keine signifikante Verbesserung der Regeneratqualität im modifizierten Score nach O'Driscoll (Bioimplantat 11,5 Punkte bzw. Bioimplantat plus Zellanreicherung 9,33 Punkte versus Leerloch 8,3 Punkte) erreicht wurde. Mankin⁷⁴ untersuchte die Pathophysiologie der mechanischen Knorpelverletzung und beschrieb, dass Knorpel, eventuell auch die darin enthaltenen Proteoglykane, einen antiadhäsiven Effekt auf potenzielle Reparaturzellen ausübt. Es ist durchaus möglich, dass die signifikant bessere Deckung in den Bioimplantatgruppen auf der verbesserten Adhärenzmöglichkeit von Reparaturzellen am Vlies gegenüber dem Restknorpel begründet liegt. Ein weiterer Faktor ist wahrscheinlich die schon oben beschriebene erhöhte primäre Zelldichte, da in beiden Bioimplantatgruppen der subchondrale Knochen eröffnet wurde bzw. eine intraoperative Zellanreicherung stattgefunden hat. Zwar ist anzunehmen, dass die Darts die Verankerungslöcher wieder nahezu versiegelt haben und ein Einsprossen von Zellen aus dem Subchondralraum verhindert wurde, dennoch blieb das zentrale Bohrloch bestehen und hat weiterhin Zellen die Möglichkeit zur Bioimplantatbesiedelung geboten.

Die fehlende verbesserte Knorpelbildung in den Bioimplantatgruppen im modifizierten Score nach O'Driscoll ist auf die strenge und schematisierte Anwendung des Beurteilungsschemas zurückzuführen. Es wurde nicht ein repräsentatives Regeneratareal bewertet, sondern immer ein zentraler Schnitt durch den ehemaligen Defekt und hier der Score anhand des minderwertigsten Gewebes erstellt. So wurde zwar die Objektivität und Reproduzierbarkeit erhalten, jedoch das Gewebe, welches den Defekt zu 75,5% bzw. 72,33% deckte, wird in der Regel nicht berücksichtigt. Ein Vergleich mit Studien anderer Arbeitsgruppen, welche ebenfalls den modifizierten Score nach O'Driscoll verwendeten, erscheint daher problematisch. Die meisten Arbeitsgruppen beschreiben eine Inhomogenität des Regenerats, welches die Ergebnisse unserer Versuche widerspiegelt, dennoch können diese Arbeitsgruppen wesentlich bessere Punktwerte im Score nachweisen. Es wird ein „repräsentatives“ Regenerat beurteilt und es erfolgte keine Angabe über die genaue Lokalisation des untersuchten Regeneratgewebes im Defekt.^{17,93,121,140} Bei Betrachtung aller Bereiche eines Defektes unserer Versuche zeigen sich fehlendes Regenerat über eine bindegewebige Narbe bis hin zu faserknorpelähnlichen und hyalinartigen

Strukturen mit und ohne Degenerationszeichen. Dieses macht deutlich, wie subjektiv eine Auswertung wird.

In einer ähnlichen Studie untersuchten Freed³⁵ und Mitarbeiter den Einfluss von PGA-Gerüsten, welche mit Chondrozyten besiedelt wurden, an ausgewachsenen Kaninchen. Sie implantierten PGA-Gerüste mit und ohne Chondrozytenbesiedelung in 3mm große Knorpeldefekte im Trochleabereich der vorderen Extremität. Bei einer Kontrollgruppe blieben die Defekte unversorgt. Die Auswertung erfolgte anhand eines modifizierten O'Driscoll Scores mit einer maximalen Punktzahl von 25 Punkten nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Wochen. Einen signifikanten Unterschied bei Punktwerten von 18 mit Chondrozytenbesiedlung und 17 ohne Chondrozytenbesiedlung zeigte sich nicht. Die Leerlochkontrollen erreichten einen Punktwert von 12. Auch in Ihren Regeneraten konnte eine starke Inhomogenität nachgewiesen werden. So bestand das Regenerat nach Chondrozytenbesiedlung überwiegend aus faserknorpelartigen Anteilen, keine Zellanreicherung führte jedoch zu einer hyalin-faserknorpelähnlichen Mischung. Vergleicht man diese Ergebnisse mit einer Untersuchung von Brittberg¹⁷, welcher ebenfalls 3mm große chondrale Defekte am Kaninchenmodel mit unterschiedlichen Methoden versorgte, zeigt sich ein wesentlicher Unterschied. Brittberg konnte nach 12 Wochen eine prozentuale Deckung der Leerlöcher von nur 29% mit einem Punktwert im O'Driscoll Score von 2,7 ähnlich zu unseren Ergebnissen (5,6 Punkte, 2% Deckung) nachweisen. Sicherlich könnte dieser Unterschied in dem längeren Nachbeobachtungszeitraum der Untersuchungen von Freed begründet liegen. Entscheidend ist jedoch, dass Freed bei der Leerlochkontrolle den subchondralen Knochen immer eröffnete und so ein Einsprossen von mesenchymalen Stammzellen ermöglichte.

Zwischen den beiden Bioimplantatgruppen zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit sowohl in der prozentualen Deckung (75,5% versus 72,33%) als auch in der Regeneratqualität nach Auswertung im modifizierten O'Driscoll Score (11,5 Punkte versus 9,33 Punkte) kein signifikanter Unterschied.

Perka et al¹⁰⁰ untersuchte in einer Studie den Einfluss einer Chondrozytenamplifikation in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch in PGLA-Vliesen ähnlich zu in dieser Arbeit verwendeten Bioimplantaten. Die Arbeitsgruppe implantierte PGLA-Vliese ohne Zellen und mit Zellen in einem Fibrin-Thrombin-Gemisch in 4mm große osteochondrale Defekte (somit Eröffnung des

subchondralen Raumes) im femoropatellaren Gleitlager bei 6 Monate alten Kaninchen. Die histologische Auswertung nach dem Wakitani-Score (0-15 Punkte, wobei 0 Punkte hyalinem Knorpel entspricht), welcher ebenfalls strukturelle Charakteristika des Regenerates, wie Gleichmäßigkeit der Oberfläche, Dicke und Verbindung zum angrenzenden Knorpel und strukturelle Integrität berücksichtigt, ergab eine signifikant bessere Regeneratqualität bei der experimentellen Gruppe mit Zellen nach 4 (3,2 Punkte) und 12 (2,8 Punkte) Wochen. Das PGLA-Vlies ohne Zellen und die Leerlochgruppe erreichten annähernd gleiche Werte (PGLA-Vlies 11,1/9,2 Punkte, Leerloch 12,9/10,6 Punkte). Leider lässt sich auch bei Perka nicht nachvollziehen, welches Regeneratareal bei deutlicher Inhomogenität beurteilt wurde.

Im Vergleich zu Perka kommt Müller et al⁸⁹ zu einer kontroversen Schlussfolgerung. Die Arbeitsgruppe untersuchte im ähnlichen Tiermodell zu Perka Bioimplantate, welche aus einer Knochen- (Poly-DL-Laktid) und einer Knorpelersatzschicht (Polyglactin/Polydioxanon) bestanden. In einer weiteren Gruppe wurden beide Ersatzschichten durch resorbierbaren Knochenzement getrennt, um ein Einsprossen von mesenchymalen Stammzellen zu verhindern. Die Bioimplantate wurden analog zu Perka in 4mm große osteochondrale Defekte allerdings im Bereich der Hauptbelastungszone der medialen Femurkondyle von ausgewachsenen Kaninchen implantiert. Die Auswertung erfolgte hier schematisiert anhand des Score nach Pineda nach 8 und 12 Wochen. Müller konnte bei signifikant besseren Ergebnissen in der Gruppe ohne Knochenzementtrennschicht schlussfolgern, dass mesenchymale Stammzellen für den Regenerationsprozess verantwortlich sein müssen, welche sich unter dem mechanischen Druck zu Knorpelzellen differenzieren und eine extrazelluläre Matrix produzieren. Die Defekte mit Knochenzementtrennschicht zeigten tendenziell sogar eine schlechtere Regeneratbildung als die Leerlöcher. Bei überwiegend hyalinartigem Regenerat im zentralen Defektbereich schließt Müller eine beginnende Regeneration vom Defektrand aus.

Die schlechten Ergebnisse in Perkas PGLA-Vliesgruppe ohne Zellen trotz fehlender Trennschicht im Vergleich zu Müller beruhen möglicherweise auf der Platzierung der Defekte von Perka außerhalb der Hauptbelastungszone in der femoropatellaren Gleitrinne und dem damit anderen mechanischen Stimulus für mesenchymale Stammzellen. Wie entscheidend ein mechanischer Stimulus für die

Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ist, zeigt sich auch in unserer Versuchsreihe. Aufgrund einer Platzierung zweier ventraler Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone in der Bioimplantatgruppe plus Zellanreicherung muss bei diesen Defekten von einer verminderten mechanischen Induktion ausgegangen werden. Betrachtet man diese beiden Defekte isoliert, zeigen sich zwar ähnliche Deckungsverhältnisse (66% außerhalb und 75,5% innerhalb der Hauptbelastungszone) bei jedoch signifikantem Unterschied in der Regeneratqualität im O'Driscoll Score (2,5 Punkte versus 12,75 Punkte). Dieses bestätigt die „kausale Histogenese“ von Pauwels und Kummer^{68,96,97}, sowie die Untersuchungen von Tägil und Aspenberg¹²⁸ über den Einfluß zyklischer Kompressionen mit definiertem Druck und Frequenz auf mesenchymalen Stammzellen. Die amplifizierten, bereits differenzierten, Chondrozyten in der o.g. Arbeitsgruppe von Perka brauchten im Vergleich zu Müllers mesenchymalen Stammzellen einen adäquaten mechanischen Stimulus zur Differenzierung wahrscheinlich nicht und führten daher neben den bereits oben erläuterten Gründen der „repräsentativen“ Regeneratbeurteilung auch außerhalb der Hauptbelastungszone in der femoropatellaren Gleitrinne zu guten Ergebnissen. Des weiteren bleibt fraglich, ob die differenzierten Chondrozyten unter den anderen mechanischen Belastungen in der femoropatellaren Gleitrinne eine extrazelluläre Matrixstruktur ähnlich zum hyalinen Knorpel überhaupt bilden konnten.

Abschliessend bleibt jedoch ein Vergleich der Studien von Perka, Müller und unserer Eigenen aufgrund der unterschiedlichen Scores sowie des höheren Regenerationspotentials von Kaninchen gegenüber Schafen problematisch.^{88,118}

Knutsen et al⁶⁵ verglich die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) und Mikrofrakturierung bei isolierten chondralen Defekten im lasttragenden Bereich der Femurkondylen in einer klinischen Studie an 80 Patienten. Am klinischen Endpunkt nach 2 Jahren führte er eine second-look Operation mit Materialgewinnung zur histologischen Evaluation durch. Sowohl klinisch als auch histologisch fand seine Arbeitsgruppe keinen Unterschied in beiden Therapiegruppen. Das Regenerat stellte sich auch hier histologisch inhomogen von bindegewebiger Narbe bis hin zu faserknorpelähnlichen und hyalinartigen Strukturen dar. Dies lässt vermuten, dass ein mechanischer Stimulus für die Differenzierung der bei der Mikrofrakturierung einsprossenden mesenchymalen

Stammzellen verantwortlich war, wohingegen die Chondrozyten bei der ACT analog zu Perka keine Differenzierung mehr durchlaufen müssen.

Bei Betrachtung unserer Ergebnisse wird klar, dass eine intraoperative Zellanreicherung mit Knochenmark keinen wesentlichen Vorteil bringt. Selbst unter Ausschluss der bereits erwähnten Defekte außerhalb der Hauptbelastungszone in der Bioimplantat plus Zellanreicherung Gruppe zeigt sich eine identische Deckung (75,5%) der Defekte in beiden Implantatgruppen. Die Regeneratqualität im modifizierten O'Driscoll Score verhält sich mit (12,5 Punkte) und ohne (11,5 Punkte) Zellanreicherung nahezu gleich. Dies könnte in der insuffizienten biomechanischen Stabilität^{50,134} der Fibrin-Thrombin-Zellmischung und eventuell auch durch negative Effekte des Fibrin und Thrombin auf Proliferation und Matrixsynthese begründet sein.^{9,26}

Ein Versuchstier der Bioimplantatgruppe musste definitionsgemäß beim Nachweis einer aseptischen Entzündung aus der Versuchreihe ausgeschlossen werden. Histologisch ließen sich nur in einigen Präparaten Reste des Bioimplantates erkennen, so dass eine fast vollständige Resorption stattgefunden hat. Die Möglichkeit einer entzündlichen zellulären Reaktion des umliegenden Gewebes unter der Beteiligung von Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen durch saure Abbauprodukte, die α -Hydroxysäuren, muss in diesem Fall in Betracht gezogen werden.^{1,15,122}

Die fehlenden signifikanten Unterschiede im modifizierten Score nach O'Driscoll zwischen Implantat- und Leerlochgruppe erklärt sich zusätzlich durch die Problematik der Auswahl des zu beurteilenden Gewebes bei inhomogenen Regeneraten. Diese Inhomogenität kann Bioimplantat, aber auch operationstechnisch bedingt sein. Einige Darts ließen sich nicht vollständig in den Verankerungslöchern versenken oder kamen quer zu liegen. Auf diese Weise konnten Druckspitzen induziert werden und eine Bioimplantatinstabilität auftreten, welche die Differenzierung der Zellen entscheidend gestört hat.³⁸ Das Auftreten von Kratzspuren in der korrespondierenden Gelenkfläche muss zusätzlich kritisch betrachtet werden (Abb.11).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bioimplantate bei chondralen Defekten zu einer besseren Defektdeckung geführt haben, auch wenn das Regenerat von unterschiedlichster Qualität war. Das Vorhandensein von

undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen scheint entscheidend für das Regenerationspotenzial durch mechanische Induktion zu sein. Ob dieses durch Eröffnung des subchondralen Raums oder durch Zellanreicherung erreicht wird, spielt anscheinend eine Rolle. Weitere Untersuchungen müssen hier folgen. Nachteilig muss jedoch das fehlende Widerlager zur mechanischen Induktion bei Eröffnung des subchondralen Knochens betrachtet werden.⁸¹ Durch Zellanreicherung ist möglicherweise eine bessere Regeneratbildung möglich, jedoch muss ein Verfahren gefunden werden, welches eine Adhäsion von Zellen im Bioimplantat suffizient erhält.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein vielversprechender Ansatz zur funktionierenden homogenen Regeneration einer chondralen Läsion gefunden ist. Grundlegende Erkenntnisse des Tissue Engineerings führten zur Planung und Durchführung dieses Versuchs. Einige Schwierigkeiten wurden uns dabei jedoch aufgezeigt. So werden momentan Bioimplantate und Verankerungsdarts bezüglich Stabilität optimiert, um einerseits eine leichtere intraoperative Handhabung und andererseits eine ungestörte Differenzierung von Zellen zu gewährleisten. Die Erhöhung der Zellbeladung scheint dabei eine große Rolle zu spielen. Dazu werden verschiedene Ansätze verfolgt. Semipermeable Membranen sollen das Abfließen der Zellen nach Eröffnung des subchondralen Knochens verhindern. Die intraoperative Anreicherung von mesenchymalen Stammzellen nach Aspiration aus dem Knochenmark wird zunehmend propagiert. Eine Fixierung der Zellen im Vlies mit viskösen Suspensionen wie z.B. Fibrin oder Agarose spielen weiterhin eine Rolle. In vitro hergestellte Chondrozyten unterscheiden sich zurzeit noch erheblich vom nativen Knorpel.⁵² Einige Arbeitsgruppen^{70,95} versuchen den fehlenden mechanischen Stimulus auf Zellen in vitro zu imitieren. In Anbetracht der komplizierten Biomechanik eines Gelenkes mit den unterschiedlichsten Druckverhältnissen ist dieses derzeit noch nicht möglich, so dass eine in vitro Herstellung von Gelenkknorpel mit der für die Stabilität so wichtigen Anordnung der Zellen und der Ausrichtung der Kollagenfibrillen bisher in weiter Ferne zu liegen scheint.^{36,49,61}

Weiterhin im Mittelpunkt der Forschung stehen die Nutzung von Wachstumsfaktoren wie IL-4, IGF-1 und aus der TGF- β Superfamilie, sowie das neu entdeckte CDMP um Proliferation, Differenzierung und Synthese von extrazellulärer Matrix positiv zu modulieren.^{32,33,86,143}

In der Folge müssen Langzeitversuche nachweisen, ob ein Regenerat haltbar ist und nicht wie in einigen Studien bereits gezeigt, im Laufe der Zeit degeneriert.^{29,45,140} Dieses scheint jedoch von der Ausgangsqualität des Regenerates abhängig zu sein. Ein weiterer Aspekt ist die Verbesserung der Bioimplantate bezüglich ihrer Biokompatibilität. Hier müssen ebenfalls Langzeitversuche zeigen, ob die beim Abbau des Bioimplantates entstehenden Abbauprodukte, insbesondere die α -Hydroxysäuren, und der möglichen resultierenden Verschiebung des pH-Wertes zu einer inflammatorischen Reaktion mit Schädigung des Regenerates oder eventuell auch des gesunden Knorpels führen.

Sollten durch Bioimplantate eine homogene flächendeckende Regeneration mit einem widerstandsfähigen Regenerat erreicht werden, ist dies nicht nur eine Behandlungsmethode für isolierte Knorpeldefekte und der damit verbundenen Arthroseentstehung. Eine Weiterentwicklung der Behandlungsoption bis hin zur vollständigen Regeneration eines arthrotischen Gelenkes wäre eventuell möglich.

5. Zusammenfassung

Läsionen im Gelenkknorpel besitzen nicht das Potential sich selbst zu regenerieren und schreiten zwangsläufig zur Arthrose des Gelenkes fort.^{21,51,52,74,81,83,99,117} Zahlreiche Studien überprüften verschiedenste Ansätze zur Knorpelregeneration in vitro und in vivo.^{17,35,65,70,93,95,100,121,128,140} Nach Konstruktion geeigneter Bioimplantate sollte anhand einer tierexperimentellen Studie am Schaf gezeigt werden, dass mittels resorbierbaren Bioimplantaten durch mechanische Induktion eine Regeneration von chondralen Defekten durch hyalinen Knorpel möglich ist. Des weiteren sollte nachgewiesen werden, dass die Regeneration durch mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark erfolgt und somit eine intraoperative Anreicherung dieser Zellen im Implantat gerechtfertigt ist.

Um diese Aufgabe zu erfüllen wurden jeweils 6 Bioimplantate ohne und mit mesenchymaler Zellanreicherung in einem Fibrin-Thrombingemisch in den lasttragenden Bereich des medialen Femurkondylus von Schafen implantiert. Als Kontrollgruppe fungierte eine Leerlochgruppe in der die Defekte unversorgt blieben. Nach 12 Wochen erfolgte die markroskopische, histologische und immunhistochemische Beurteilung der entstandenen Defektregenerate.

In beiden Bioimplantatgruppen zeigte sich eine signifikant bessere Deckung der Defekte mit Regeneratgewebe. Dieses war jedoch von einer starken Inhomogenität mit bindegewebigen, fibroartilaginären und hyalinen Anteilen geprägt. Die Regeneratqualität zeigte unter strengen Beurteilungskriterien daher keinen signifikanten Unterschied zur Leerlochgruppe. Die zusätzliche Anreicherung der Bioimplantate mit mesenchymalen Stammzellen brachte keinen Vorteil. Dies ist möglicherweise in der insuffizienten biomechanischen Stabilität^{50,135} der Fibrin-Thrombin-Zellmischung und eventuell auftretende negative Effekte des Fibrin und Thrombin auf Proliferation und Matrixsynthese begründet.^{9,26} Ein Versuchstier entwickelte im Versuchszeitraum eine aseptische Entzündung im operativ versorgten Gelenk. Zwei außerhalb der Hauptbelastungszone liegende Defekte der Zellanreicherungsgruppe zeigten eine sehr schlechte Regeneratqualität, welches die entscheidende Rolle der mechanischen Induktion bestätigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zu keiner suffizienten Knorpelneubildung im benutzten Model kam. Durch mechanische Induktion scheint jedoch eine Umdifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen in einen suffizienten hyalinen Knorpel möglich. Ursachen für die fehlende vollständige Regeneration könnten in der Struktur der Bioimplantate, sowie in der problematischen intraoperativen Handhabung liegen. Eine weitere Verbesserung der chemischen und biomechanischen Eigenschaften der Bioimplantate sollte angestrebt werden. Möglicherweise sind dann bessere Ergebnisse in weiteren tierexperimentellen Untersuchungen zu erwarten.

6. Literaturverzeichnis

1. AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A.: A technique to control the pH in the vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *J Biomed Mater Res* 1997;38:105-114
2. AMECKE, B.; BENDIX, D.; ENTENMANN, G.: Resorbable polyesters: composition, properties, applications. *Clin Mater* 1992;10: 47-50
3. AMIEL, D.; HARWOOD, F.L.; HOOVER, J.A.; MEYERS, M.: A histological and biomechanical assessment of the cartilage matrix obtained from in vitro storage of osteochondral allografts. *Connect Tissue Res* 1989;23:89-99
4. ANDRAL, G.: *Précis d'anatomie pathologique*. 1827
5. ATHANASIOU, K.A.; SHAH, A.R.; HERNANDEZ, R.J.; LEBARON, R.G.: Basic Science of Articular Cartilage Repair. *Clin Sports Med* 2001;20(2):223-247
6. BARBUCCI, R.; MAGNANI, A.; RAPPUOLI, R.; LAMPONI, S.; CONSUMI, M.: Immobilisation of sulphated hyaluronan for improved biocompatibility. *J Inorg Biochem.* 2000;79:119-125
7. BAUMGÄRTNER, M.R.; CANNON, W.D. JR; VITTORI, J.M.; SCHMIDT, E.S.; MAURER, R.C.: Arthroscopic debridement of the arthritic knee. *Clin Orthop* 1990;253:197-202
8. BENNINGHOFF, A.: Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss verschiedenartiger mechanischer Beanspruchung auf den Knorpel. *Verh Anat Ges* 1924;33:194
9. BENSAD, W.; TRIFFITT, J.T.; BLANCHAT, C.; OUDINA, K.; SEDEL, L.; PETITE, H.: A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003; 24: 2497-2502
10. BENYA, P.D.; SCHAFFER, J.D.: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gel. *Cell* 1982;30:215-224
11. BERESFORD, J.N.: Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 1989;240:270-280
12. BLUNK, T.; SIEMINSKI, A.L.; GOOCH, K.J.; COURTER, D.L.; HOLLANDER, A.P.; NAHIR, A.M.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FREED, L.E.: Differential Effects of Growth Factors on Tissue-Engineered Cartilage. *Tissue Eng* 2002;Vol.8(1):73-84
13. BÖHM, H.J.; KÖNINGS, P.: Adulte Stammzellen: Perspektive für die Gewebezüchtung? *Trauma Berufskrankh* 2001;3(Suppl 3):375-377
14. BONAVENTURE, J.; KADHOM, N.; COHEN SOLAL, L.; NG, K.H.; BOURGUIGNON, J.; LASSELIN, C.; FREISINGER, P.: Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994;212:97-104
15. BRITT, J.C.; PARK, S.S.: Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124: 671-677
16. BRITTBERG, M.; LINDAHL, A.; NILSSON, A.; OHLSSON, C.; ISAKSSON, O.; PETERSON, L.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994; 331: 889-895

17. BRITTBERG, M.; NILSSON, A.; LINDAHL, A.; OHLSSON, C.; PETERSON, L.: Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop*. 1996; 270-283
18. BRITTBERG, M.; TALLHEDEN, T.; JANSSEN, E.S.; LINDAHL, A.; PETERSON, L.: Autologous Chondrocytes Used for Articular Cartilage Repair. An Update. *Clin Orthop*. 2001; 391S: 337-348
19. BRUDER, S.P.; FINK, D.J.; CAPLAN, A.I.: Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994;56:283-294
20. BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J.: Articular cartilage. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg* 1997;79A:600-611
21. BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J.: Articular cartilage. Part II: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79:612-632
22. CALLAHAN, L.F.; RAO, J.; BOUTAUGH, M.: Arthritis and women's health: Prevalence, impact and prevention. *Am J Prev Med* 1996;12:401-409
23. CAPLAN, A.I.: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641-650
24. CAPLAN, A.I.; ELYADERANI, M.; MOCHIZUKI, Y.; WAKITANI, S.; GOLDBERG, V.M.: Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 1997;342:254-269
25. CARTER, D.R.; BEAUPRE, G.S.; GIORI, N.J.; HELMS, J.A.: Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop* 1998;355S:41-55
26. CATELAS, I.; SESE, N.; WU, B.M.; DUNN, J.C.; HELGERSON, S.; TAWIL, B.: Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng*. 2006; 12(8): 2385-2396
27. CHU, C.R.; CONVERY, F.R.; AKESON, W.H.; MEYERS, M.; AMIEL, D.: Articular cartilage transplantation: Clinical results in the knee. *Clin Orthop* 1999;360:159-168
28. COLETTI, J.M.; AKESON, W.H.; WOO, S.L.-Y.: A comparison of the physical behaviour of normal articular cartilage and the arthroplasty surface. *J Bone Joint Surg* 1972;54A:147-160
29. CONVERY, F.R.; AKESON, W.H.; KEOWN, G.H.: The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop*. 1972; 82: 253-262
30. DORE, S.; PELLETIER, J.P.; DIBATTISTA, J.A.; TARDIF, G.; BRAZEAU, P.; MARTEL-PELLETIER, J.: Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of IGF-I binding proteins but are unresponsive to its stimulation. *Arthritis Rheum* 1994;37:253-263
31. DOUNCHIS, J.S.; COUTTS, R.D.; AMIEL, D.: Cartilage repair with autogenic perichondrium cell/polylactic acid grafts: a two-year study in rabbits. *J Orthop Res* 2000;18:512-515
32. ERLANGER, L.; NG, C.K.; ULRICH, R.; KRIEGER, S.; LUYTEN, F.P.: Presence of cartilage-derived morphogenetic proteins in articular cartilage and enhancement of matrix replacement in vitro. *Arthritis Rheum* 1998;41:263-273
33. FORTIER, L.A.; MOHAMMED, H.O.; LUST, G.; NIXON, A.J.: Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 2002;84B(2):276-288

34. FRAGONAS, E.; VALENTE, M.; POZZI-MUCELLI, M.; TOFFANIN, R.; RIZZO, R.; SILVESTRI, F.; VITTUR, F.: Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 2000;21:795-801
35. FREED, L.E.; GRANDE, D.A.; LINGBIN, Z.; EMMANUAL, J.; MARQUIS, J.C.; LANGER, R.: Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 1994; 28: 891-899
36. FREED, L.E.; HOLLANDER, A.P.; MARTIN, I.; BARRY, J.R.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.: Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 1998;240:58-65
37. FRIEDLAENDER, G.E.; STRONG, D.M.; TOMFORD, W.W.; MANKIN, H.J.: Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am* 1999;30:583-588
38. FROST, H.M.: Perspectives: a vital biomechanical model of synovial joint design. *Anat Rec.* 1994; 240: 1-18
39. FULLER, J.A.; GHADIALLY, F.N.: Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage. *Clin Orthop* 1972;86:193-205
40. FURUKAWA, T.; EYRE, D.R.; KOIDE, S.; GLIMCHER, M.J.: Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg* 1980;62A:79-89
41. GENESER F.: Histologie. Köln 1990:Deutscher Ärzte Verlag GmbH – ISBN 3-7691-0163-4
42. GHADIALLY, F.N.; THOMAS, I.; ORYSCHAK, A.F.; LALONDE, J.M.: Long-term results of superficial defects in articular cartilage: a scanning electron-microscope study. *J Pathol* 1977;121:213-217
43. GILL T.: The Role of the Microfracture Technique in the Treatment of Full-Thickness Chondral Injuries. *Op Tech Sports Med* 2000;8:138-140
44. GLOWACKI, J.; TREPMAN, E.; FOLKMAN, J.: Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Biol Med* 1983;172:93-98
45. GOMAR-SANCHO, F.; GASTALDI, O.E.: Repair of osteochondral defects in articular weightbearing areas in the rabbit's knee. The use of autologous osteochondral and meniscal grafts. *Int Orthop* 1987;11:65-69
46. GRANDE, D.A.; PITMAN, M.I.; PETERSON, L.; MENCHE, D.; KLEIN, M.: The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 1989;7:208-218
47. HANGODY, L.; KISH, G.; KARPATI, Z.; UDVARHELYI, I.; SZIGETI, I.; BELY, M.: Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: Application in clinical practice. *Orthop* 1998;21:751-756
48. HARWIN, S.: Arthroscopic debridement for Osteoarthritis of the knee: Predictors of Patient Satisfaction. *Arthroscopy* 1999;15:142-142
49. HEATH, C.A.; MAGARI, S.R.: Mini-review: Mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro. *Biotechnology and Bioengineering* 1996;50:430-437
50. HOMMINGA, G.N.; BUMA, P.; KOOT, H.W.J.: Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand* 1993;64:441-445

51. HUNZIKER, E.B.; DRIESANG, I.M.K.; SAAGER C.: Structural Barrier Principle for Growth Factor-Based Articular Cartilage Repair. *Clin Orthop* 2001;391S:182-189
52. HUNZIKER, E.B.: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432-463
53. HURTING, M.; EVANS, P.; PEARCE, S.; CLARNETTE, R.; MINIACI, A.: The effect of graft size and number on the outcome of mosaic arthroplasty resurfacing: An experimental model in sheep. Proceedings. *Arthroscopy Association North Am.* 1999;18:16-17
54. ITAY, S.; ABRAMOVICI, A.; NEVO, Z.: Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop* 1987;220:284-303
55. JACKSON, D.W.; SCHEER, M.J.; SIMON, T.M.: Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options. *Acad Orthop Surg* 2001;9(1):37-52
56. JACKSON, W.J.; SIMON, T.M.; ABERMAN, H.M.: Symptomatic Articular Cartilage Degeneration: The Impact in the New Millennium. *Clin Orthop* 2001;391S:14-25
57. JANSSON, V.; MÜLLER, P.E.; THAL, S.; ARNHOLZ, C.; MILZ, S.; KOCH, K.U.; REFIOR, H.J.: Ein neues resorbierbares Knochen-Knorpel-Ersatztransplantat. Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie. *Orthopäde* 2000; 29:151-157
58. JOHNSON, L.: Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 1986;2:54-69
59. JOHNSTONE, B.; HERING, T.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M.; YOO, J.U.: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-272
60. KADIYALA, S.; YOUNG, R.G.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P.: Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997;6:125-134
61. KANDEL, R.A.; BOYLE, J.; GIBSON, G.; CRUZ, T.; SPEAGLE, M.: In vitro formation of mineralized cartilagenous tissue by articular chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997;33:174-181
62. KAS, H.S.: Chitosan: Properties, preparations and application to microparticulate systems. *Microencapsul* 1997;14:689-711
63. KAWASAKI, K.; OCHI, M.; UCHIO, Y.; ADACHI, N.; MATSUSAKI, M.: Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulphate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol* 1999;179:142-148
64. KIELTY, C.M.; WHITTAKER, S.P.; GRANT, M.E.; SHUTTLEWORTH, C.A.: Type VI collagen microfibrils: Evidence for a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol* 1992;118:979-990
65. KNUTSEN, G; ENGBRETSEN, L. ; LUDVIGSEN, T.C., DROGSET, J.O.; GRONTVEDT, T.; SOLHEIM, E.; STRAND, T.; ROBERTS, S.; ISAKSEN, V.; JOHANSEN, O.: Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee. A Randomized Trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:455-464

66. KULKARNI, R.K.; MOORE, E.G.; HEGYELI, A.F.; LEONARD, F.: Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J Biomed Mater Res.* 1971;5: 169-181
67. KUMAGAI, K.; SAITO, T.; KOSHINO, T.: Articular cartilage repair of rabbit chondral defect: promoted by creation of periarticular bony defect. *J Orthop Sci.* 2003;8(5):700-706
68. KUMMER, B.: Grundlagen zur Pauwels-Theorie der funktionellen Anpassung des Knochens. *Orthopäde.* 1995;24:387-393
69. LANGER, R.; VACANTI, J.P.: Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926
70. LEE, D.A.; BADER, D.L.: Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose. *J Orthop Res* 1997;15:181-188
71. LU, L.; ZHU, X.; VALENZUELA, R.G.; CURRIER, B.L.; YASZEMSKI, M.J.: Biodegradable Polymer Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Clin Orthop* 2001;391S:251-270
72. MANKIN, H.J.: Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1962; 44-A: 688-698
73. MANKIN, H.J.; LAING, P.G.: Protein and ribonucleic acid synthesis in articular cartilage of osteoarthritic dogs. *Arthritis Rheum.* 1967; 10: 444-450
74. MANKIN H.J.: Current concepts review: The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 1982;64A:460-466
75. MANLIN, T.I.; MNAYMNEH, W.; LO, H.F.: Cryopreservation of articular cartilage. Ultrastructural observations and long term results of experimental distal femoral transplantation. *Clin Orthop* 1994;303:18-32
76. MANSOUR, J.M.; MOW, V.C.: The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressures. *J Bone Joint Surg* 1976;58A:509-516
77. MARTIN, I.; SHASTRI, V.P.; PADERA, R.F.; YANG, J.; MACKAY, A.J.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FREED, L.E.: Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J Biomed Mater Res* 2001;55:229-235
78. MASOUD, I.; SHAPIRO, F.; KENT, R.; MOSES, A.: A longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for body length, body weight, femoral length, and tibial length. *J Orthop Res.* 1986; 4: 221-231
79. MATTIOLI-BELMONTE, M.; GIGANTE, A.; MUZZARELLI, R.A.; POLITANO, R.; DE BENEDITTIS, A.; SPECCHIA, N.; BUFFA, A.; BIAGINI, G.; GRECO, F.: N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage. *Med Biol Eng Comput* 1999;37:130-134
80. MEACHIN G.: The effect of scarification on articular cartilage in the Rabbit. *J Bone Joint Surg* 1963;45B:150-161
81. MESSNER, K.; LOHMANDER, L.S.; GILLQUIST, J.: Neocartilage after artificial cartilage repair in the rabbit: histology and proteoglycan fragments in joint fluid. *J Biomed Mater Res.* 1993;27:949-954

82. MESSNER K.: The Long-Term Prognosis for Severe Damage to Weight-Bearing Cartilage in the Knee: A 14-Year Clinical and Radiographic Follow-up in 28 Young Athletes. *Acta Orthop Scand* 1996;67:165-168
83. MILZ, S.; NEUFANG, J.; HIGASHIYAMA, I.; PUTZ, R.; BENJAMIN, M.: An immunohistochemical study of the extracellular matrix of the tarsal plate in the upper eyelid in human beings. *J.Anat.* 2005;206(1):37-45
84. MINAS, T.; CHIU, R.: Autologous chondrocyte implantation. *Am J Knee Surg* 2000;13(1):41-50
85. MITROVIC, D.; QUINTERO, M.; STANKOVIC, A.; RYCKEWAERT, A.: Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage: Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* 1983;49:309-316
86. MIURA, Y.; PARVIZI, J.; FRITZSIMMONS, J.S.; O'DRISCOLL, S.W.: Brief exposure to high-dose transforming growth factor- β 1 enhances periosteal chondrogenesis in vitro. A Preliminary Report. *J Bone Joint Surg* 2002;84A(5):793-799
87. MONT, M.; JONES, L.C.; VOGELSTEIN, B.N.; HUNGERFORD, D.S.: Evidence of Inappropriate Application of Autologous Cartilage Transplantation Therapy in an Uncontrolled Environment. *Am J Sports Med* 1999;27(5):617-620
88. MORRIS, E.A.; PELUSO, D.; GILL, T.J.; POWERS, J.; GLASSO, C.: The choice of the animal model of articular cartilage repair studies. [Abstract]. *Transactions of the 4th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Society Group.* 2001;260
89. MUELLER, P.E.; SCHRIMPF, F.; MILZ, S.; KIRCHER, J.; DÜRR, H.R.; WEGENER, B.; PELLENGAHR, C.; JANSSON, V.: Repair of osteochondral defects in the knee by resorbable bioimplants in a rabbit model. *Acta Orthop.* 2006; 77(6): 981-985
90. NEHRER, S.; BREINAN, H.A.; RAMAPPA, A.; HSU, H.P.; MINAS, T.; SHORTKROFF, S.; SLEDGE, C.B.; YANNAS, I.V.; SPECTOR, M.: Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials.* 1998;19:2313-2328
91. NIEDERAUER, G.G.; SLIVKA, M.A.; LEATHERBURY, N.C.; KORVICK, D.L.; HARROFF, H.H.; EHLER, W.C.; DUNN, C.J.; KIESWETTER, K.: Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials.* 2000; 21: 2561-2574
92. O'DRISCOLL, S.W.; SALTER, R.B.: The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop* 1986;208:131-140
93. O'DRISCOLL, S.W.; KEELEY, F.W.; SALTER, R.B.: Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg* 1988;70A:595-606
94. O'DRISCOLL, S.W.: Articular cartilage regeneration using periosteum. *Clin Orthop* 1999;367S:186-203
95. PALMOSKI, M.J.; BRANDT, K.D.: Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro. *Arthritis Rheum* 1984;27:675-681

96. PAUWELS, F.: *Biomechanics of the Normal and Diseased Hip*. Berlin 1976: Springer Verlag
97. PAUWELS, F.: *Biomechanics of the Locomotor Apparatus*. Berlin 1980: Springer Verlag
98. PEARCE, S.; HURTIG, M.B.; CLARNETTE, R.; KALRA, M.; COWAN, B.; MINIACI, A.: An investigation of 2 techniques for optimizing joint surface congruency using multiple cylindrical osteochondral autografts. *Arthroscopy* 2001;17:50-55
99. PERKA, C.; SCHULTZ, O.; LINDENHAYN, K.; SPITZER, R.-S.; MUSCHIK, M.; SITTINGER, M.; BURMESTER, G.R.: Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin matrices. *Clin Exp Rheumatology* 2000;18:13-22
100. PERKA, C.; SCHULTZ, O.; SITTINGER, M.; ZIPPEL, H.: Chondrozytentransplantation in PGLA/Polydioxanon-Vliesen. *Orthopäde* 2000;29:112-119
101. PETERSON, L.; MINAS, T.; BRITTBERG, M.; NILSSON, A.; JANSSAN, E.; LINDAHL, A.: Two to Nine Year Outcomes After Autologous Chondrocyte Transplantation of the Knee. *Clin Orthop* 2000;374:212-234
102. PINEDA, S.; POLLACK, A.; STEVENSON, S.; GOLDBERG, V.; CAPLAN, A.: A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat (Basel)*. 1992; 143: 335-340
103. PISTNER, H.; STALLFORTH, H.; GUTWALD, R.; MUHLING, J.; REUTHER, J.; MICHEL, C.: Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo. Part II: Physico-mechanical behaviour of implants. *Biomaterials*. 1994; 15: 439-450
104. POOLE, A.R.; KOJIMA, T.; YASUDA, T.; MWALE, F.; KOBAYASHI, M.; LAVERTY, S.: Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clin Orthop* 2001;391S:26-33
105. POOLE, A.R.; PIDOUX, I.; REINER, A.; ROSENBER, L.: An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *J Cell Biol* 1982;93:921-937
106. PRIDIE, A.H.: The method of resurfacing osteoarthritic joints. *J Bone Joint Surg* 1959;41B:618-623
107. RAHFOTH, B.; WEISSER, J.; STERNKOPF, F.; AIGNER, T.; VON DER MARK, K.; BRAUER, R.: Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:50-65
108. RANDIN, E.L.; PARKER, H.G.; PUGH, J.W.; STEINBERG R.S., PAUL, I.L.; ROSE R.M.: Response of joints to impact loading. Relationship between trabecular microfractures and cartilage degeneration. *J Biomech*.1973;6:51-57
109. REDDI, A.H.: Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998;16:247-252
110. RODRIGO, J.J.; SCHNASER, A.M.; REYNOLDS JR, H.M.; BIGGART III, J.M.; LEATHERS, M.W.; CHISM, S.E.; THORSON, E.; GROTZ, T.; YANG, Q.M.: Inhibition of the immune response to experimental fresh osteoarticular allografts. *Clin Orthop* 1989;243:235-253

111. ROSENBERG, L.C.; BUCKWALTER, J.A.: Cartilage proteoglycans. In: Kuettner, K.E.; Schleyerbach, R.; Hascall, V.C. (eds) *Articular cartilage biochemistry*. New York 1985, Raven Press, S.39-57
112. ROUX, W.: *Terminologie der Entwicklungsmechanik der Tiere und Pflanzen*. Leipzig 1912: Wilhelm Engelmann
113. RUDERT, M.; HIRSCHMANN, F.; WIRTH, C.J.: Wachstumsverhalten von Chondrozyten auf unterschiedlichen Trägersubstanzen. *Orthopädie* 1999;28:68-75
114. SCHNEIDER, S.; SCHMITT, G.; MAU, H.; SCHMITT, H.; SABO, D.; RICHTER, W.: Prävalenz und Korrelate der Osteoarthritis in der BRD. Repräsentative Ergebnisse des ersten Bundesgesundheitsurvey. *Der Orthopäde* 2005;Vol.34 (8): 782-790
115. SCHUMACHER, B.L.; HUGHES, C.E.; KUETTNER, K.E.; CATERSON, B.; AYDELOTTE, M.B.: Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. *J Orthop Res* 1999;17:110-120
116. SCHUMAN, L.; BUMA, P.; VERSLEYEN, D.; DE MAN, B.; VAN DER KRAAN, P.M.; VAN DER BERG, W.B.; HOMMINGA, G.N.: Chondrocyte behavior within different types of collagen gel in vitro. *Biomaterials* 1995;16:809-814
117. SGAGLIONE, N.A.; MINIACI, A.; GILLOGLY S.D.; CARTER T.R.: Update on Advanced Surgical Techniques in the Treatment of Traumatic Focal Articular Cartilage Lesions in the Knee. *J Arthroscopic and Related Surg* 2002;18(2):9-32
118. SHORTKROFF, S.; BARONE, L.; HSU, H.P.; WRENN, C.; GAGNE, T.; CHI, T.; BREINAN, H.; MINAS, T.; SLEDGE, C.B.; TUBO, R.; SPECTOR, M.: Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 1996;17(2):147-154
119. SITTINGER, M.; BUJIA, J.; HAMMER, C.; MINUTH, W.W.; BURMEISTER, G.R.: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 1994; 15:451-456
120. SOKOLOFF, L.: Articular chondrocytes in culture: matrix production and hormonal effects. *Arthr Rheum* 1976;19(Suppl 3):426-429
121. SOLCHAGA, L.A.; YOO, J.U.; LUNDBERG, M.; DENNIS, J.E.; HUIBREGTSE, B.A.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I.: Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *J Orthop Res*. 2000; 18: 773-780
122. SPAIN, T.L.; AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A.: New technique to extend the useful life of a biodegradable cartilage implant. *Tissue Eng* 1998;4:343-352
123. SPRAGUE, N.F. III: Arthroscopic debridement for degenerative knee joint disease. *Clin Orthop* 1981;160:118-123
124. STEADMAN, J.R.; RODKEY, W.G.; SINGELTON, S.B.; BRIGGS, K.K.: Microfracture technique for full thickness chondral defects: technique and clinical results. *Op Tech in Ortho* 1997;7:300-307
125. STEVENSON, S.; SHAFFER, J.W.; GOLDBERG, V.M.: The humoral response to vascular and nonvascular allografts of bone. *Clin Orthop* 1996;323:86-95

126. STOCKWELL, R.A.; MEACHIN, G.: The Chondrocytes. In *Freeman MAR(ed). Adult Articular Cartilage*. Ed 2. Tunbridge Wells, UK, Pitman Medical 1979:69-144
127. SUH, J.K.; MATTHEW, H.W.: Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000;21:2589-2598
128. TÄGIL, M.; ASPENBERG, P.: Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo. *J Orthop Res* 1999;17:200-204
129. VACANTI, C.A.; UPTON, J.: Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg.* 1994; 21: 445-462
130. VACANTI, C.A.; VACANTI, J.P.: Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994; 27: 263-276
131. VACHON, A.M.; MCILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W.; NORRDIN, R.W.; POWERS, B.E.: Neochondrogenesis in free intra-articular, periosteal, and perichondral autografts in horses. *Am J Veter Res* 1989;50:1787-1794
132. VAN BEUNINGEN, H.M.; VAN DER KRAAN, P.M.; ARNTZ, O.J.; VAN DEN BERG, W.B.: Transforming growth factor- β 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 1994;71:279-290
133. VAN BEUNINGEN, H.M.; GLANSBEEK, H.L.; VAN DER KRAAN, P.M.; VAN DEN BERG, W.B.: Differential effects of local application of BMP-2 or TGF- β 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis and Cartilage* 1998;6:306-317
134. VAN SUSANTE, J.L.; BUMA, P.; VAN OSCH, G.J.; VERSEYEN, D.; VAN DER KRAAN, P.M.; VAN DER BERG, W.B.; HOMMINGA, G.N.: Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand* 1995;66:549-556
135. VAN SUSANTE, J.L.; BUMA, P.; SCHUMAN, L.; HOMMINGA, G.N.; VAN DEN BERG, W.B.; VETH, R.P.: Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 1999;20:1167-1175
136. VON DER MARK, K.; GAUSS, V.; VON DER MARK, H.; MÜLLER, P.: Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977;267:531-532
137. WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.J.; YOUNG, R.G.; MANSOUR, J.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M.: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1994;76A:579-592
138. WAKITANI, S.; GOTO, T.; YOUNG, R.G.; MANSOUR, J.M.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I.: Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 1998;4:429-444

139. WAKITANI, S.; IMOTO, K.; YAMAMOTO, T.; SAITO, M.; MURATA, N.; YONEDA, M.: Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002;10:199-206
140. WEI, X.; MESSNER, K.: Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res.* 1999; 46: 539-548
141. WERNER, A.; FUß, M.; KRAUSPE, R.: Operative gelenkerhaltende Verfahren bei Gelenkknorpelschäden: Knorpel induzierende Techniken und Knorpeltransplantation. *Dt.Ärzteblatt* 2003;9:469-474
142. WOLFF, J.: *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin 1892: Hirschwald
143. WORSTER, A.W.; BROWER-TOLAND, B.D.; FORTIER, L.A.; BENT, S.J.; WILLIAMS, J.; NIXON, A.J.: Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res* 2001;19:738-749

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
BMP-2	Bone morphogenetic Protein-2
CDMP	Cartilage derived morphogenic protein
FTZ	Fibrin-Thrombin-Zellgemisch
HIV	Human immunodeficiency virus
IGF-1	Insulin like growth factor-I
IL-4	Interleukin-4
MHC	Major Histocompatibility Complex
NaCl	Natriumchlorid
OATS	Osteochondrales autograft Transplantations-System
PDGF	Platelet derived growth factor
PGA	Polyglycolicacid
PLA	Polylactidacid
TGF- β	Transforming growth factor-beta

Selbstständigkeitserklärung

„Ich Philipp Bergschmidt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „*Resorbierbare Bioimplantate zur Regeneration von chondralen Defekten in einer tierexperimentellen Studie am Schaf*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmars Jansson und Prof. Dr. med. Peter Müller für die Überlassung des Themas und die nützlichen Hinweise und Gespräche, welche den Abschluss der vorliegenden Promotion möglich machten. Besonderer Dank gebührt Dr. med. Bernd Wegner für die Einführung in die Thematik und zahlreichen Diskussionen, in denen er mir mit Rat zur Seite stand. Des weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Stefan Milz für die Auswertung der Histologien und die gute Zusammenarbeit mit der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken. Meinem derzeitigen Klinikdirektor Prof. Dr. med. habil. Wolfram Mittelmeier gebührt für die ständige Motivation und das schnelle Gelingen dieser Promotionsschrift ein besonderer Dank.

Nicht vergessen möchte ich die Mitarbeiterinnen des Labors, vor allem Frau Feine und Frau Hansmann für die Hilfe bei der Erstellung und Aufarbeitung der Präparate.

Besonders möchte ich Frau Meike Berger-Lohr für die inspirierende und konstruktive Zusammenarbeit danken.

Abschließend möchte ich meinen ganz besonderen Dank gegenüber meinen Eltern zum Ausdruck bringen, die mir eine solide Ausbildung in behüteter Familie ermöglichten.

**Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie
Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Mittelmeier**

**Resorbierbare Bioimplantate zur Regeneration von
chondralen Defekten in einer tierexperimentellen Studie am
Schaf**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock - Anstalt öffentlichen Rechts**



vorgelegt von

**Philipp Bergschmidt aus Bernau
Rostock, 2007**

Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger

Thesen

1. Läsionen im Gelenkknorpel, die z.B. durch Trauma oder Chondromalazie entstehen, besitzen kein Potential zur Selbstregeneration und müssen somit als irreversibel betrachtet werden.
2. Die derzeitigen zahlreichen klinischen Therapiemöglichkeiten bei chondralen Läsionen können eine kurzzeitige Besserung der subjektiven Beschwerden erzielen. Einige Therapieoptionen sind sogar in der Lage, die Bildung eines Regeneratgewebes zu ermöglichen. Die Langzeitergebnisse mit frühzeitiger Degeneration des Regeneratgewebes und damit der vorzeitigen Entstehung einer Arthrose bleiben dennoch unbefriedigend.
3. Experimentelle Therapieansätze versuchen gezielt die Differenzierung von Vorläuferzellen, den mesenchymalen Stammzellen, sowie die Matrixproduktion von bereits differenzierten Chondrozyten in vitro zu beeinflussen. Hierbei kommen sog. Bioreaktoren zum Einsatz. Ernährung, mechanische Effekte und Stimulation durch Wachstumsfaktoren können auf diese Weise genauestens modifiziert werden.
4. Trägermaterialien, wie z.B. synthetische bioresorbierbare Polymere, Fibrin oder Kollagen-Gele bieten als dreidimensionale Konstrukte Vorteile im Rahmen des „Tissue engineerings“. Je nach Trägermaterial sind unterschiedliche Wirkungen auf Proliferation, Differenzierung und Synthese der extrazellulären Matrix beschrieben.
5. Die „kausalen Histogenese“ beschreibt, dass mesenchymale Stammzellen sich entsprechend der lokalen funktionellen Anforderungen zum jeweiligen Zielgewebe differenzieren. Ein mechanischer Stimulus scheint somit Voraussetzung für die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und somit der Bildung eines hyalinen Regenerates.
6. Ziel der Arbeit war nach Konstruktion geeigneter Bioimplantate in einer tierexperimentellen Studie am Schaf zu zeigen, dass durch mechanische Induktion eine Regeneration von chondralen Defekten durch hyalinen Knorpel möglich ist. Des weiteren sollte nachgewiesen werden, ob die Anreicherung mit Knochenmarkszellen, mit den darin enthaltenen

mesenchymalen Stammzellen, eine Verbesserung der Regeneratqualität zu erzielen vermag.

7. Die Verwendung von Bioimplantaten führt zu einer signifikant besseren quantitativen Regeneratbildung im Vergleich zur Leerlochgruppe. Bei stark inhomogener Regeneratbildung, sowie der strengen Beurteilungskriterien ist es jedoch zu keiner signifikanten Besserung bezüglich der Qualität des Regenerates durch die Verwendung von Bioimplantaten gekommen.
8. Eine Defektlage außerhalb der Hauptbelastungszone führt trotz Versorgung mit einem Bioimplantat zu qualitativ schlechter Regeneratbildung. Ein mechanischer Stimulus zur Differenzierung, Proliferation und Synthese der extrazellulären Matrix scheint daher entscheidend für eine Regeneratbildung zu sein.
9. Das Vorhandensein von mesenchymalen Stammzellen im Implantat, entweder durch intraoperative Anreicherung oder durch Eröffnung der subchondralen Raumes, scheint Voraussetzung für die Bildung eines Regenerates zu sein.
10. Ein Vergleich einzelner tierexperimenteller Untersuchungen ist aufgrund der Inhomogenität der Regenerate mit bindegewebigen, fibrokartilaginären und hyalinen Anteilen und bei nicht standardisierten Beurteilungskriterien der einzelnen Studien nur bedingt möglich.
11. Ursachen für eine nicht vollständige Regeneration der chondralen Läsionen könnten in der Struktur der Bioimplantate, sowie in der problematischen intraoperativen Handhabung liegen. Eine weitere Verbesserung der chemischen und biochemischen Eigenschaften der Bioimplantate sollte angestrebt werden.
12. Langzeituntersuchungen müssen nachweisen, ob ein Regenerat haltbar ist und nicht im Laufe der Zeit degeneriert und somit innerhalb kürzester Zeit zur Entstehung einer Arthrose führt.